

# Retinal Tolerance and Pharmacokinetics of Levofloxacin

|       |                                                                                             |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/9333">http://hdl.handle.net/2297/9333</a>               |

## レボフロキサシンの網膜におよぼす影響およびその眼内動態

金沢大学医学部医学科眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

大久保 真 司

抗菌剤レボフロキサシン (levofloxacin, LVFX) の眼科領域における安全な局所および全身的使用法を決めることを目的として, LVFXおよびその光学異性体DR-3354の網膜におよぼす影響を白色ウサギ摘出眼杯網膜電図 (electroretinogram, ERG) のa波, b波および律動様小波 (oscillatory potential, OP) を指標として比較検討し, またLVFXの硝子体内注入が網膜におよぼす影響を白色および有色ウサギにおいてERGのa波, b波, c波, OPおよび視覚誘発電位 (visually evoked potential, VEP) ならびに組織学的検査法を指標として検討し, さらにLVFX経口投与後の眼内移行およびLVFX硝子体内注入後の眼内動態を白色および有色ウサギにおいて比較検討した。摘出眼杯ERGによる検討では, LVFX 300 $\mu$ MおよびDR-3354 100 $\mu$ M灌流ではERG各波に変化はなかったが, LVFX 500 $\mu$ MおよびDR-3354 300 $\mu$ M灌流ではOP振幅は低下した。摘出眼杯ERGに変化をきたさない薬物濃度はDR-3354に比してLVFXで高く, 光学異性体間で網膜におよぼす影響に差異がみられた。LVFX 200 $\mu$ gまたは500 $\mu$ gの硝子体内注入では白色および有色ウサギともにERG各波に変化はなかったが, LVFX 1000 $\mu$ gまたは2000 $\mu$ gの硝子体内注入では白色および有色ウサギともにOPの振幅が一過性に低下した。いずれの注入量においてもERGのc波およびVEPの早期成分に変化はなく, 組織学的にも網膜に明らかな変化はなかった。LVFX 20mg/kg経口投与2時間後において, LVFX濃度はメラニン非含有眼組織では白色ウサギと有色ウサギとの間で有意には相違しなかったが, 虹彩毛様体および網脈絡膜などのメラニン含有眼組織では白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高かった。LVFX 500 $\mu$ g硝子体内注入後の硝子体内LVFX濃度は白色および有色ウサギともに各測定時点において近似した値であり同様の推移を示したが, 虹彩毛様体および網膜色素上皮・脈絡膜などのメラニン含有眼組織では測定したいずれの時点においても白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高く, LVFXのメラニン親和性はその眼内動態に重大な影響をおよぼすことが判明した。LVFX 500 $\mu$ g硝子体内注入は電気生理学および組織学的にウサギ網膜に明らかな影響をおよぼさず, かつ注入後少なくとも24時間にわたり細菌性眼内炎の主要な起因菌の90%最小発育阻止濃度を凌駕するので, その臨床応用が期待される。しかしLVFXがメラニン含有眼組織内に長時間にわたり残留するので, LVFXの頻回の局所投与および長期間の全身投与の際には眼毒性の発現に十分注意すべきである。

**Key words** levofloxacin, melanin, intravitreal injection, retinal tolerance, intraocular pharmacokinetics

フルオロキノロン系合成抗菌剤 (フルオロキノロン剤) が近年盛んに開発されており, すでに数種のフルオロキノロン剤が経口剤や点眼液の形で臨床に应用されている。しかしこれらのフルオロキノロン剤がメラニン親和性を有し<sup>1)</sup>, 長期にわたる内服や点眼によりメラニン含有眼組織内に高濃度に移行蓄積することが報告され<sup>2)~6)</sup>, それによる眼毒性の発現が危惧されるようになった<sup>7)</sup>。一方, 眼科領域では白内障手術における眼内レンズ挿入術の増加に伴い *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)<sup>8)9)</sup> や表皮ぶどう球菌<sup>10)</sup>などの弱毒菌による遅発性眼内炎が問題となってきた。さらに第3世代セフェム系薬剤の多用によりメチシリン耐性黄色ぶどう球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) およびメチシリン耐性表皮ぶどう球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE) が誘導され<sup>11)</sup>, MRSAおよびMRSEによる眼感染症の増加が懸

念されている<sup>12)</sup>。これらの起因菌はフルオロキノロン剤に感受性をもつことから, フルオロキノロン剤は眼科領域において重要な役割を占めてきており<sup>13)</sup>, したがって眼に対するフルオロキノロン剤の安全性の検討がますます重要となりつつある。

眼科領域で広く用いられているフルオロキノロン剤の一つであるオフロキサシン (ofloxacin, OFLX) は2種の光学異性体を1:1の割合に含むラセミ体であることが以前より知られていた<sup>14)</sup>。そのS-体がレボフロキサシン (levofloxacin, LVFX), R-体がDR-3354である<sup>14)</sup>。*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* および *Pseudomonas aeruginosa* などの主要な眼感染症起因菌<sup>15)16)</sup>を含むほとんどの菌に対するLVFXの抗菌活性はOFLXのほぼ2倍であり, これに対してDR-3354の抗菌活性が著しく低いことからLVFXがOFLXの抗菌力の活性本体であるとされている<sup>16)</sup>。近年になりLVFXの立体選択的

平成9年4月15日受付, 平成9年5月22日受理

Abbreviations: CPFX, ciprofloxacin; ERG, electroretinogram; GA, glutaraldehyde; GM, gentamicin sulfate; HPLC, high performance liquid chromatography; ID<sub>50</sub>, 50% inhibitory dose; LVFX, levofloxacin; MIC<sub>90</sub>, 90% minimum inhibitory concentration; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSE, methicillin-resistant

合成が可能になり、その成果は既に経口剤として臨床に応用されている。そこで本研究ではフルオロキノロン剤のうち眼科領域においても今後使用する機会が増えると思われるLVFXを選択し、その眼科的使用に際して必要と考えられる以下の点につき検討した。すなわち(1) LVFXおよびDR-3354の白色ウサギ網膜におよぼす影響を比較検討することにより光学異性体間で網膜におよぼす影響に差異がないかを調べ、(2) LVFX経口投与後の眼内移行を白色ウサギと有色ウサギとで検討することに

よりLVFXのメラニン親和性が眼内動態におよぼす影響を評価し、(3) LVFX硝子体内許容注入量の決定を目的として、LVFXの硝子体内注入がウサギ網膜におよぼす影響を検討し、網膜に対する安全性を評価した。さらに(4) 網膜毒性をきたさないと考えられる硝子体内注入量を投与した際のLVFXの眼内動態もあわせて検討した。本研究においてLVFXの網膜毒性および眼内動態を明らかにすることは、眼科臨床において細菌性眼内炎の治療にLVFXを眼内に直接投与する際の安全性の確立に寄

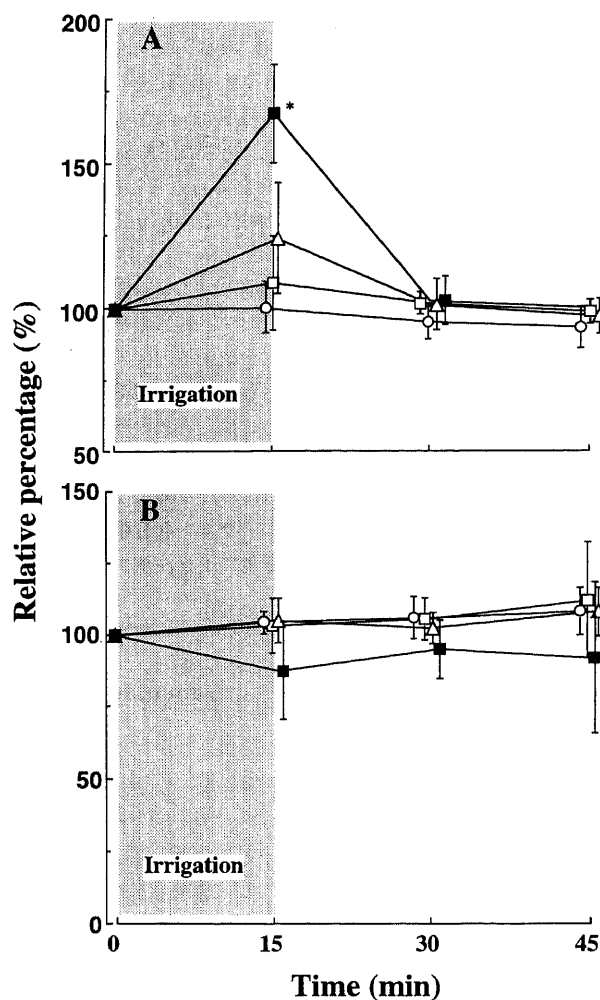


Fig. 1. Changes of the latency (A) and amplitude (B) of the a-wave with the LVFX-containing solution in the in-vitro eye-cup of the albino rabbits. The concentrations of LVFX in the irrigation solution were 100  $\mu$ M (○), 300  $\mu$ M (□), 500  $\mu$ M (△) and 1000  $\mu$ M (■). The stimulus intensity was  $3.5 \times 10^2$  lux. The percentages of the latencies and amplitudes in the LVFX-containing solutions to those at the end of the initial perfusion of the control solution (time 0), (tested solution/control solution)  $\times$  100, were plotted against time after onset of perfusion with the LVFX-containing solution (time 0). The shaded areas indicate the period of perfusion of the LVFX-containing solution. Each data point shows the  $\bar{x} \pm$  SD. \*,  $p < 0.01$  versus the initial perfusion of the control solution (time 0).

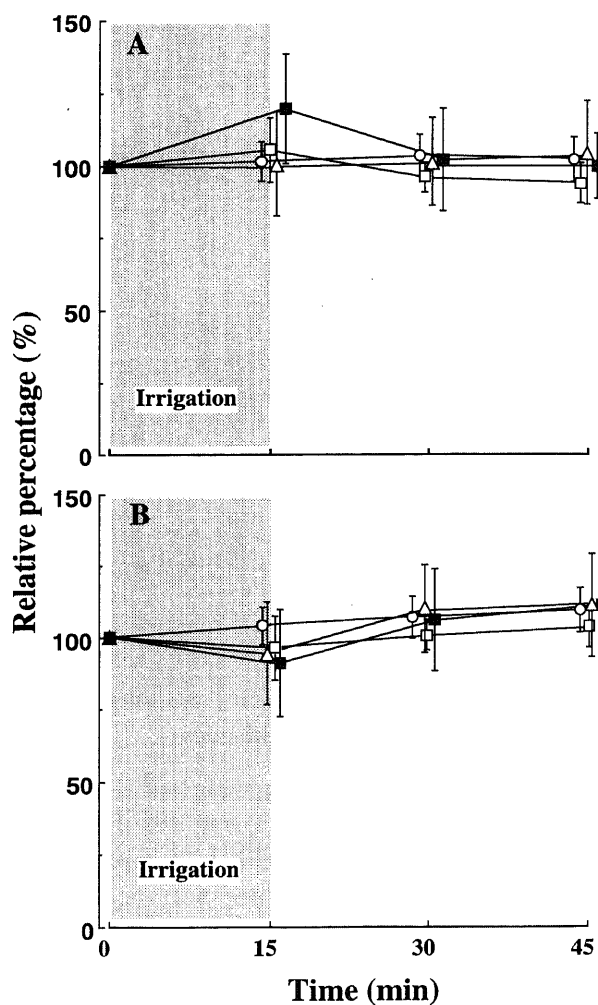


Fig. 2. Changes of the latency (A) and amplitude (B) of the a-wave with the DR-3354-containing solution in the in-vitro eye-cup of the albino rabbits. The concentrations of DR-3354 in the irrigation solution were 100  $\mu$ M (○), 300  $\mu$ M (□), 500  $\mu$ M (△) and 1000  $\mu$ M (■). The stimulus intensity was  $3.5 \times 10^2$  lux. The percentages of the latencies and amplitudes in the DR-3354-containing solutions to those at the end of the initial perfusion of the control solution (time 0), (tested solution/control solution)  $\times$  100, were plotted against time after onset of perfusion with the DR-3354-containing solution (time 0). The shaded areas indicate the period of perfusion of the DR-3354-containing solution. Each data point shows the  $\bar{x} \pm$  SD.

*Staphylococcus epidermidis*; ND, not detectable; NFLX, norfloxacin; OFLX, ofloxacin; OP, oscillatory potential; *P. acnes*, *Propionibacterium acnes*; VEP, visually evoked potential

与するのみならず、長期に全身投与されたLVFXの網膜に対する副作用の予防にも有用と考えられる。

#### 材料および方法

#### I. 摘出眼杯網膜電図 (electroretinogram, ERG)

##### 1. 実験動物、摘出眼杯の作成および使用薬剤

体重2～3kgの白色ウサギ20匹40眼を使用した。24時間以上の暗順応の後に、暗赤色光下で以下の手順によって網膜、脈絡膜および強膜からなる眼杯を作製した。まずペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®, 大日本製薬, 大阪) 200mgの静脈内注射で白色ウサギを麻酔死させ、直ちに両眼球を摘出した。100%酸素ガスを1.0 l/分の割合で通気した対照浸漬液 (容積4 l, 組成は後述) 中に摘出した眼球を入れ、角膜輪部より後極側約2～3mmの位置で眼球を前後に分割し、後半の眼杯を実験に使用した。

使用したLVFXおよびDR-3354は研究用原末 (第一製薬, 東

京) であった。

##### 2. 電気生理学的検査

浸漬液容器は2個の相対するプラスチック製容器から成り、各容器の容積はともに125mlであった。各容器の相対する面にはウサギ眼の強膜曲率半径にはほぼ適合するように半球状のカップが取り付けられており、その中央に開けた直径約10mmの孔を塞ぐように両容器間に眼杯を固定した。灌流液を塩化ビニール製のチューブ (内径3mm) に流し、ウォーマーコイルを経由することによって $31 \pm 1^\circ\text{C}$ に加温した。加温された浸漬液を浸漬液容器の底部から流入させ、上部から吸引排除して各容器に25ml/分の流速で灌流した。また各容器の浸漬液には100%酸素ガスを1.0 l/分の割合で通気し、浸漬液のpHを8.0～8.2に維持した<sup>17)</sup>。

対照浸漬液には、長山第Ⅱ液<sup>18)</sup>を使用した。長山第Ⅱ液の組成はNaCl 119.50mM, KCl 3.60mM,  $\text{CaCl}_2$  1.15mM,  $\text{MgSO}_4$  1.06mM, グルコース 26.00mM,  $\text{NaHCO}_3$  25.10mMおよび

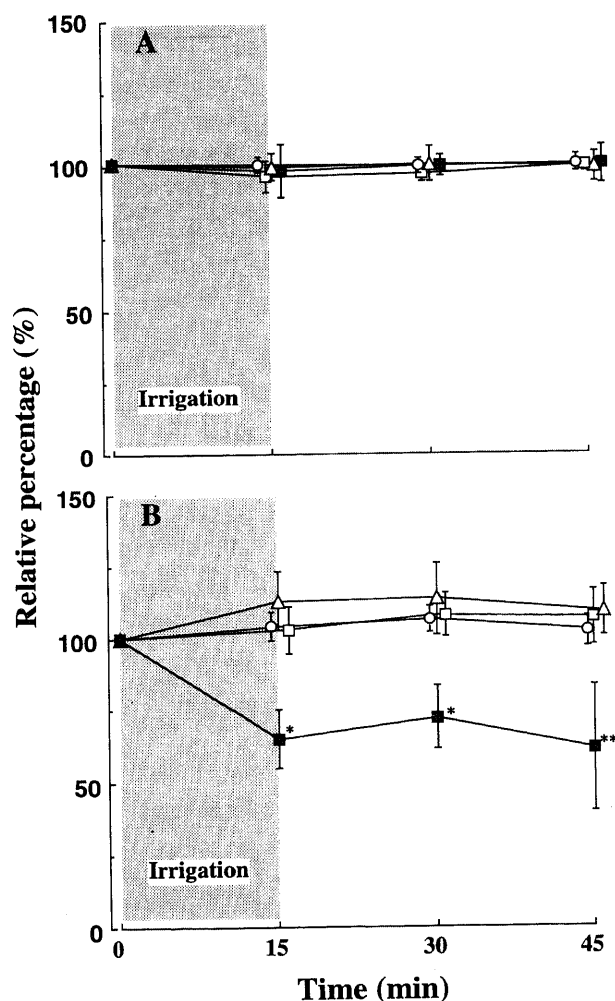


Fig. 3. Changes of the latency (A) and amplitude (B) of the b-wave with the LVFX-containing solution in the in-vitro eye-cup of the albino rabbits. The concentrations of LVFX in the irrigation solution were 100  $\mu\text{M}$  (○), 300  $\mu\text{M}$  (□), 500  $\mu\text{M}$  (△) and 1000  $\mu\text{M}$  (■). Other conditions were the same as in Fig. 1. \*,  $p < 0.01$  and \*\*,  $p < 0.05$  versus the initial perfusion of the control solution (time 0).

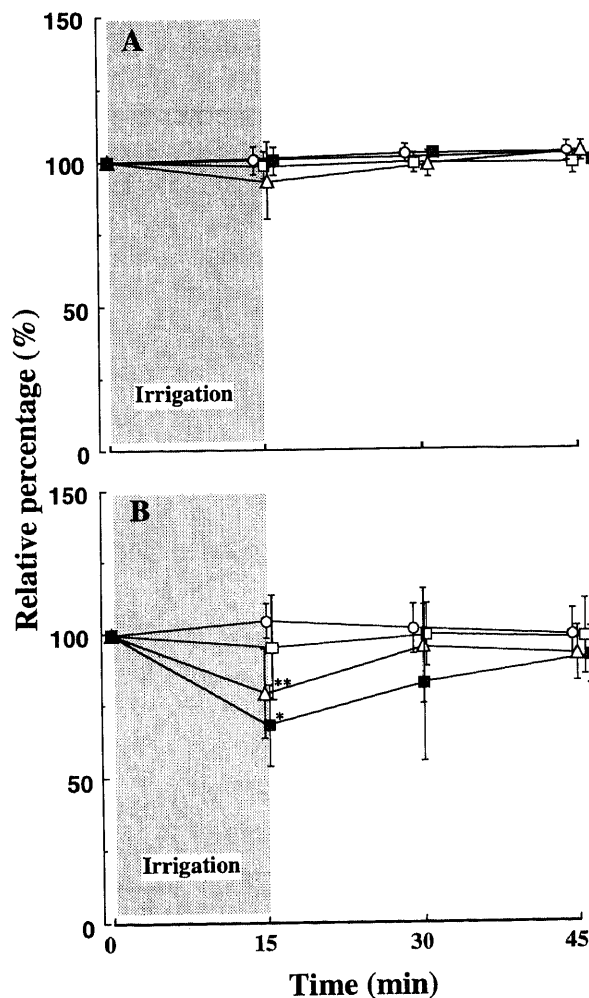


Fig. 4. Changes of the latency (A) and amplitude (B) of the b-wave with the DR-3354-containing solution in the in-vitro eye-cup of the albino rabbits. The concentrations of DR-3354 in the irrigation solution were 100  $\mu\text{M}$  (○), 300  $\mu\text{M}$  (□), 500  $\mu\text{M}$  (△) and 1000  $\mu\text{M}$  (■). Other conditions were the same as in Fig. 2. \*,  $p < 0.01$  and \*\*,  $p < 0.05$  versus the initial perfusion of the control solution (time 0).

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3.00mMであり、その浸透圧は $300 \pm 3\text{mOsmol}$ であった。

光刺激には、直流安定化電源Xenon Arc 45 (Xebex, 東京)にて点灯したキセノンアーク灯を光源とするERG用光刺激装置(三双製作所, 東京)を使用した。光路には中性フィルター、中性ウエッジおよび集光レンズが組み込まれている。刺激光強度を調整して得られた白色矩形波光(網膜面照度 $3.5 \times 10^2 \text{ lux}$ , 持続時間200ミリ秒)を直径約6mmの硝子繊維束を介して眼杯の網膜側に照射した。眼杯をはさむ2個の浸漬液容器内に固定された一対の銀・塩化銀電極NS型(日本光電, 東京)によってERGを導出し、交流増幅器366型(日本電気三栄, 東京)で増幅した後、信号加算機7TO7A(日本電気三栄)上に表示した。増幅器の時定数をa波およびb波記録では0.3秒、律動様小波(oscillatory potential, OP)の記録では3ミリ秒とした。

対照浸漬液を灌流してERG(a波, b波およびOP)を記録し、その15分後に再びERGを記録して両者の波形の振幅および潜時に変化がないことを確認してこの波形を対照波形とした。LVFXまたはDR-3354を $100 \mu\text{M}$ ,  $300 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$ および $1000 \mu\text{M}$ の濃度で対照浸漬液に添加し、薬物添加浸漬液を作成した。対照浸漬液を薬物添加浸漬液に交換し、15分後に再びERGを記録した。さらに浸漬液を対照浸漬液にもどして15および30分後にERGを記録した。

ERGのa波およびb波の振幅値をa波では基線からa波の底まで、b波ではa波の底よりb波の頂点までとした。OP振幅の計測は米村<sup>19)</sup>の方法に準じた。略記すると、時定数3ミリ秒で記録したOPの上向き(硝子体側陽性方向)および下向きの振れ

をそれぞれ頂点潜時の短い順に $O_1$ ,  $O_2$ ,  $O_3$ および $O_4$ ,  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$ および $N_4$ と呼称した。 $O_1$ 振幅はERG波形のa波の底から $O_1$ に至る曲線と基線との交点と $N_1$ を結ぶ直線に $O_1$ の頂点より垂線をおろしその交点までを、 $O_2$ 振幅は $N_1$ と $N_2$ を結ぶ直線と $O_2$ の頂点よりの垂線との交点までとした。 $O_3$ および $O_4$ 振幅も $O_2$ 振幅と同様に計測した。 $O_1$ から $O_4$ までの振幅を加算したものをOP振幅とした。

## II. 経口投与後の眼内移行の測定

### 1. 実験動物

体重2.5~3kgの白色ウサギ7匹および体重2~2.5kgの有色ウサギ7匹を使用した。各ウサギにはウサギ用固型飼料RM-3(船橋農場, 千葉)を与え、水を自由に摂取させた。予備飼育を2週間以上行なった。眼球のオートラジオグラフィーによる検討では各測定時点ごとに白色ウサギおよび有色ウサギ各1匹を、また眼各組織内濃度の測定では白色および有色ウサギ各4匹を使用した。

### 2. 標識化合物、薬剤の調整および薬剤投与方法

標識化合物として $^{14}\text{C}$ -LVFX(第一製薬)を使用した。その比放射能は $2.88\text{MBq/mg}$ であり、薄層クロマトグラフィーのかき取り法で測定した放射化学的純度は97%以上であった。薄層クロマトグラフィーに際しては、吸着剤として厚さ0.25mmのシリカゲル60F<sub>254</sub> No. 5714(E. Merck, ダルムシュタット, ドイツ), 展開溶媒としてクロロホルム:メタノール:28%アンモニア水=2:2:1およびエタノール:28%アンモニア水=7:3を使用した。測定感度を考慮して、 $^{14}\text{C}$ -LVFXに非標識LVFX(第一製薬)を比放射能が $1.85\text{MBq/kg}$ となるように加えた。混

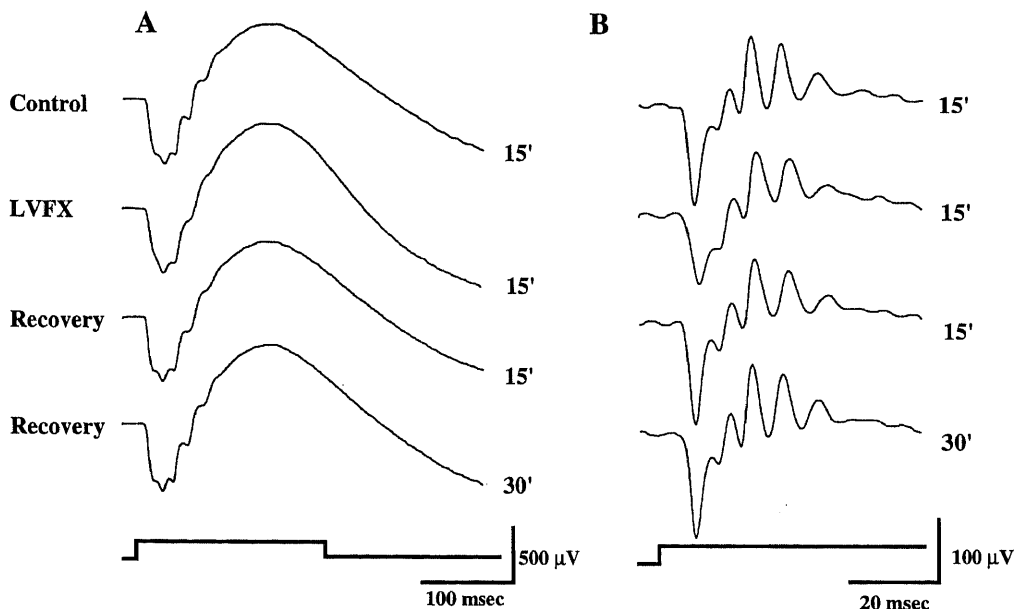


Fig.5. Effects of  $500 \mu\text{M}$  LVFX on the ERG of the in-vitro eye-cup of an albino rabbit. The a-wave and the b-wave were not deteriorated by  $500 \mu\text{M}$  LVFX. The oscillatory potential was diminished with  $500 \mu\text{M}$  LVFX. Amplifier time constant was 0.3 sec in A and 3 msec in B. Responses in A and B were obtained from the same eye-cup. The uppermost traces show responses during initial perfusion with Nagayama's control solution. The second traces show responses during perfusion with the LVFX-containing solution. The third and fourth traces show responses after the LVFX-containing solution was washed out by Nagayama's control solution. Upward deflection indicates positivity of the vitreous side in reference to the scleral side in all figures showing the ERG in the present paper. Rectangular waveforms at the bottom indicate the onset (upward deflection) and cessation (downward deflection) of stimulus light in this figure and all other figures showing the ERG or the visually evoked potential. Numerals at the right indicate the time after onset of perfusion with the LVFX-containing solution or Nagayama's control solution. The stimulus intensity was  $3.5 \times 10^2 \text{ lux}$  at the retina.

合した薬剤を注射用蒸留水（大塚製薬，東京）に溶解し，LVFXとして10mg/mlの濃度に調整した。上記薬液2ml/kg（LVFXとして20mg/kg）をゴム製カテーテルを用いてウサギの胃内に強制的に投与した。投与に際して絶食処置は施さなかった。

### 3. 眼球のオートラジオグラフィー

白色および有色ウサギに $^{14}\text{C}$ -LVFXを経口投与し，1，2および6時間後の各時点で白色および有色ウサギ各1匹をネンブター<sup>®</sup>（大日本製薬）200mgの静脈内注射で麻酔死させた。直ち

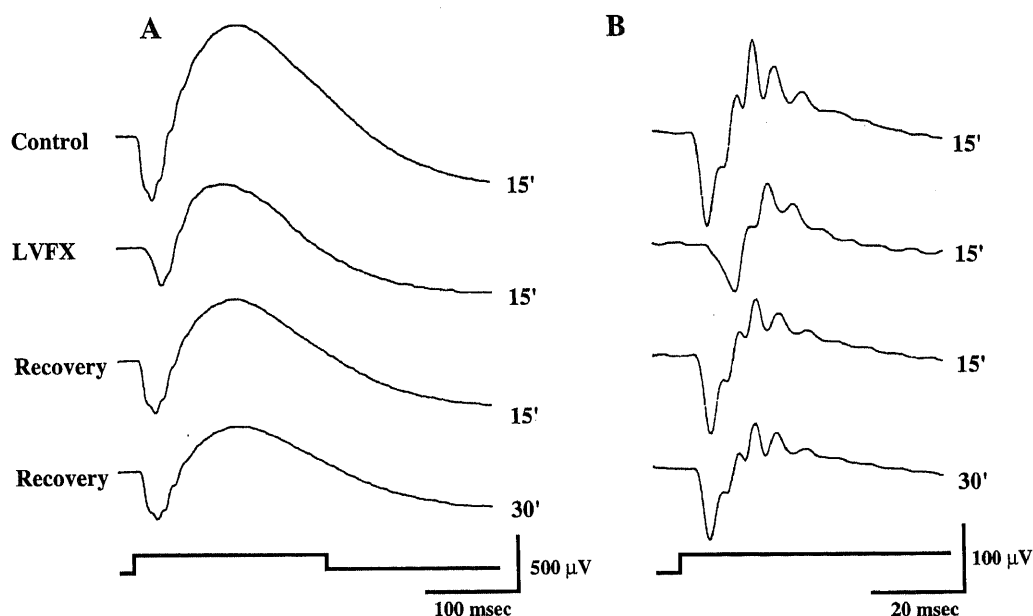


Fig. 6. Effects of  $1000\ \mu\text{M}$  LVFX on the ERG of the in-vitro eye-cup of an albino rabbit. The a-wave was not deteriorated by  $1000\ \mu\text{M}$  LVFX. The b-wave and the oscillatory potential were diminished with  $1000\ \mu\text{M}$  LVFX. Amplifier time constant was 0.3 sec in A and 3 msec in B. Responses in A and B were obtained from the same eye-cup. Other conditions were the same as in Fig. 5.

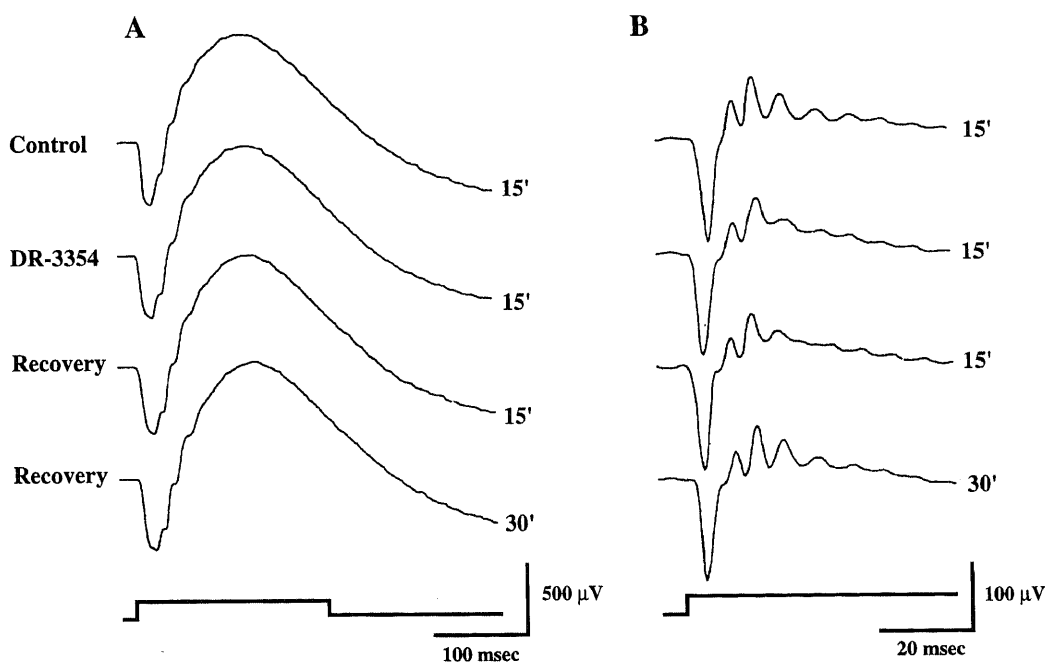


Fig. 7. Effects of  $300\ \mu\text{M}$  DR-3354 on the ERG of the in-vitro eye-cup of an albino rabbit. The a-wave and the b-wave were not deteriorated by  $300\ \mu\text{M}$  DR-3354. The oscillatory potential was diminished with  $300\ \mu\text{M}$  DR-3354. Amplifier time constant was 0.3 sec in A and 3 msec in B. Responses in A and B were obtained from the same eye-cup. The uppermost traces show responses during initial perfusion with Nagayama's control solution. The second traces show responses during perfusion with the DR-3354-containing solution. The third and fourth traces show responses after the DR-3354-containing solution was washed out by the control solution. Numerals at the right indicate the time after onset of perfusion with the DR-3354-containing solution or Nagayama's control solution. Other conditions were the same as in Fig. 5.

に両眼球を摘出し、 $-70^{\circ}\text{C}$ のドライアイス・アセトンで凍結した。次に、5%カルボキシセルロースで眼球をマイクロームステージ上に包埋し、 $-70^{\circ}\text{C}$ のドライアイス・アセトンで再度凍結した。その後クライオマイクロームPMV 450MP (LKB, ストックホルム, スウェーデン) に固定し、 $-25^{\circ}\text{C}$ 前後で厚さ約 $35\mu\text{m}$ の凍結切片を接着テープNo. 810 (住友スリーエム, 東京) に貼り付けて削りとった。得られた凍結切片を $-25^{\circ}\text{C}$ 前後で凍結乾燥し、切片表面を厚さ $4\mu\text{m}$ の保護膜ダイアホイル (東京産業洋紙, 東京) で覆った後にX線フィルムMARG<sup>3</sup>Hタイプ (コニカ, 東京) と密着させた。 $4^{\circ}\text{C}$ で28日間露出した後にX線フィルムを現像し、眼球のオートラジオグラムを作製した。次にビデオカメラを用いた画像処理システムにより得られた眼球切片像とそのオートラジオグラムを拡大疑似カラー表示し、それぞれを重ね合わせた像を各時点ごとに作製した。

#### 4. 眼組織内LVFX濃度の測定

白色ウサギおよび有色ウサギ各4匹に $^{14}\text{C}$ -LVFXを経口投与した。代謝ケージに収め、投与2時間後にネプタール® (大日本製薬) 200mgの静脈内注射による麻酔を施し、腹大動脈より採血を行ない致死させた。得られた血液から $500\mu\text{l}$ を採取し、放射能測定用試料とした。残りの血液を遠心分離( $1800\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15分) して血清 $500\mu\text{l}$ を採取し、放射能測定用試料とした。続いて各ウサギにおいて右眼球を摘出し、角膜輪部から27ゲージ針で前房水を吸引した後に、実体顕微鏡SMZ-2T (ニコン, 東京) 下で角膜、結膜、外眼筋、強膜、虹彩毛様体、水晶体、硝子体および網脈絡膜の各組織に分割した。組織採取の際に他の組織が混入しないように十分に注意した。さらに頭蓋骨を除去して視神経、大脳および小脳組織片も採取した。なお有色ウサギにおいては神経網膜と網膜色素上皮・脈絡膜とを分割して測定した。すなわち摘出した眼球を前後に分割し、硝子体を除

いた後に視神経を中心に後眼部を4分割した。後眼部は3%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液 (glutaraldehyde, GA) (pH 7.2~7.4) に1~2分間浸漬して固定した後に、視神経乳頭部からピンセットで神経網膜を剥離した (GA処理法)。また虹彩毛様体では、分離せず一塊として計測した。

採取した血液、血清および各組織を組織燃焼用濾紙カップK-ASC-11 (東洋濾紙, 東京) に入れ、湿重量を測定した後に恒温器IC-102 (ヤマト科学, 東京) で $40^{\circ}\text{C}$ で24時間以上乾燥させた。次に組織自動燃焼装置ASC-113 (ALOKA, 東京) で燃焼し、放射能測定に供した。その際、二酸化炭素吸収剤としてモノエタノールアミン:メタノール=2:3を、シンチレーターとしてAQUASOL-2 (Du Pont NEN Research Products, ボストン, マサチューセッツ, 米国):メタノール=7:5を用いた。各試料中の放射能を液体シンチレーションカウンターLSC-903 (ALOKA) で2分間計数した。計数効率の補正は外部標準線源によるチャンネル比法による。

得られた値から各組織内放射能濃度を求めた。さらに放射能濃度をLVFX濃度に換算し、LVFX濃度を白色および有色ウサギ4眼の平均値±標準偏差 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) で表示した。放射能の検出限界をバックグランド値 (dpm) の2倍とした。4眼中3眼以上が検出限界以下の場合にはND (not detectable) と表示し、4眼中2眼または1眼が検出限界以下の場合には検出限界以下を示した例もバックグランド値との差の数値を用いて、4眼の平均値および標準偏差を算出した。2群間の有意差検定にはWilcoxon順位検定を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

#### Ⅲ. LVFX硝子体内注入後の網膜の変化の測定

##### 1. 実験動物、使用薬剤および注入薬剤濃度

体重2~3kgの白色および有色ウサギ各23匹を使用した。各

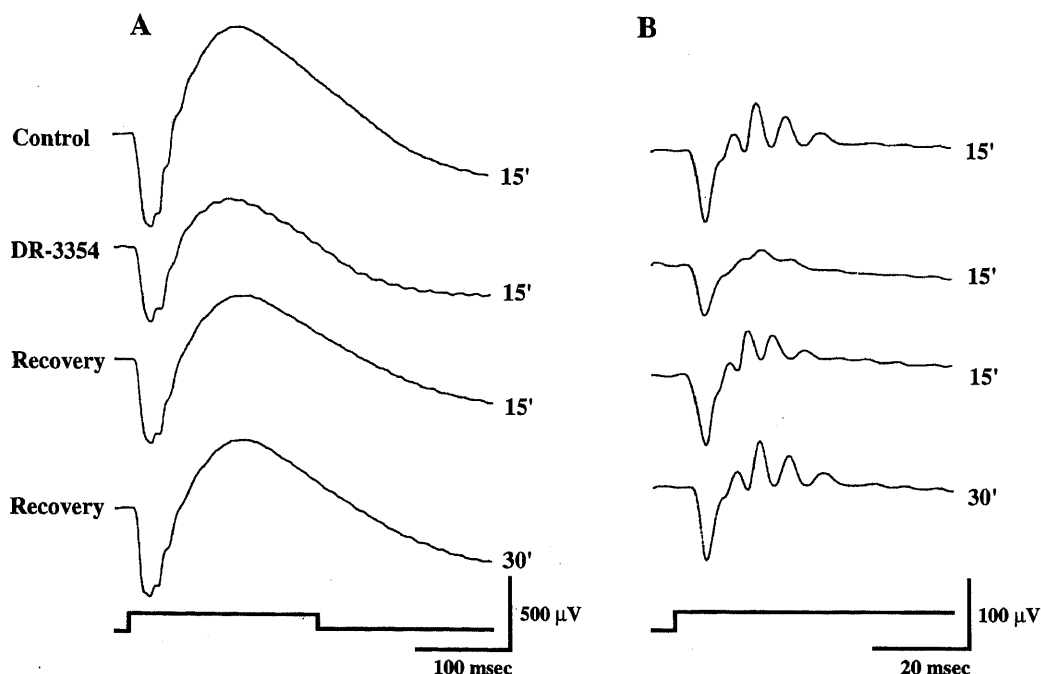


Fig. 8. Effects of  $500\mu\text{M}$  DR-3354 on the ERG of the in-vitro eye-cup of an albino rabbit. The a-wave was not deteriorated by  $500\mu\text{M}$  DR-3354. The b-wave and the oscillatory potential were diminished with  $500\mu\text{M}$  DR-3354. Amplifier time constant was 0.3 sec in A and 3 msec in B. Responses in A and B were obtained from the same eye-cup. Other conditions were the same as in Figs. 5, 7.

ウサギにはウサギ用固型飼料RM-3 (船橋農場) を与え、水を自由に摂取させた。予備飼育を1週間以上行った。白色および有色ウサギ各20匹に塩酸ケタミン (ケタール\* 50, 三共, 東京) およびキシラジン塩酸塩 (セラクター\* 2% 注射液, バイエル, レバークーゼン, ドイツ) の7:1の混合液0.5~1ml/kgの筋肉内注射<sup>20)</sup>によって全身麻酔を行い、視覚誘発電位 (visually evoked potential, VEP) 用関電極を次のように埋め込んだ。すなわち先端部以外の表面を絶縁した直径0.3mmのステンレス線2本をよりあわせて作製した電極を、ラムダの前方6mmかつ側方6mmの頭蓋骨にあけた小孔 (左方および右方にそれぞれ1箇所) を通して大脳硬膜上<sup>21)~23)</sup>に置き、歯科用セメント松風パイル (松風陶歯製造, 京都) で頭蓋骨に固定した。電極の他端側を皮膚面から突出させ、皮膚を縫合した。これを通じてVEP電位を導出した。上記の処置から1か月以上を経過した後に、前記と同様の全身麻酔下でVEP波形が記録されることを確認して実験に使用した。

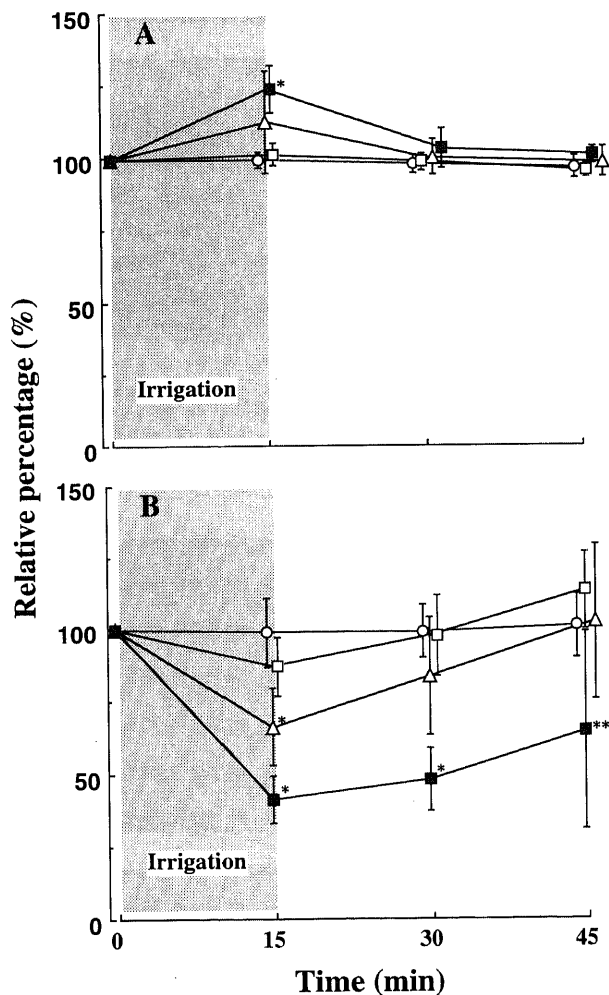


Fig. 9. Changes of the latency (A) of the second peak ( $O_2$ ) of the oscillatory potential and amplitude (B) of the oscillatory potential ( $O_1+O_2+O_3+O_4$ ) with the LVFX-containing solution in the in-vitro eye-cup of the albino rabbits. The concentrations of LVFX in the irrigation solution were 100  $\mu$ M (○), 300  $\mu$ M (□), 500  $\mu$ M (△) and 1000  $\mu$ M (■). Other conditions were the same as in Fig. 1. \*,  $p<0.01$  and \*\*,  $p<0.05$  versus the initial perfusion of the control solution (time 0).

硝子体内注入前の眼底検査で網膜に異常がみられたウサギおよび硝子体内注入前のERGおよびVEP検査で左右差の明らかなウサギは用いなかった。

使用したLVFXは研究用原末 (第一製薬) であった。LVFXを人工眼内灌流液 (オペガード\* MA, 千寿製薬, 大阪) で溶解して, 2, 5, 10および20mg/mlの濃度のLVFX溶液を作成した。

## 2. 硝子体内注入法

薬剤注入前に0.4%塩酸オキシプロカイン (ペノキシール\*, 参天製薬) による点眼麻酔を行った。薬液の硝子体内注入による眼圧上昇を避けるために、球結膜上より上直筋付着部を鑷子で固定し、1ml用注射器に接続した27ゲージの注射針を角膜輪部より前房内にその切り口を角膜側に向けて約2mm刺入して、0.1mlの前房水を吸引除去した。次に上直筋付着部を鑷子で固定したままの状態、1ml用注射器に接続した30ゲージの注射針を用いて角膜輪部より後方約2mmの強膜から硝子体腔ほぼ中央に針の切り口を水晶体側に向けて刺入し、硝子体内に

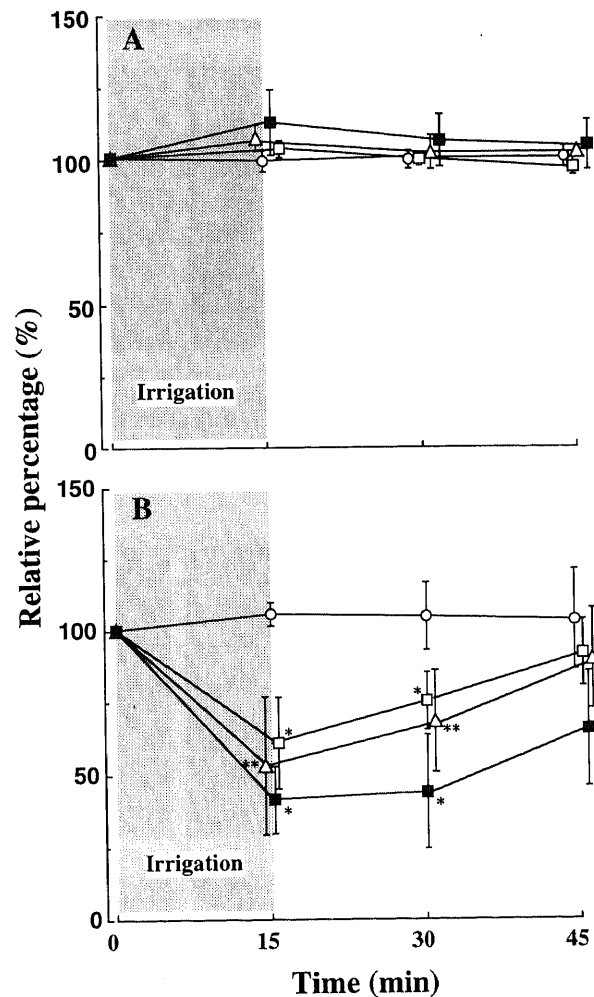


Fig. 10. Changes of the latency (A) of the second peak ( $O_2$ ) of the oscillatory potential and amplitude (B) of the oscillatory potential ( $O_1+O_2+O_3+O_4$ ) with the DR-3354-containing solution in the in-vitro eye-cup of the albino rabbits. The concentrations of DR-3354 in the irrigation solution were 100  $\mu$ M (○), 300  $\mu$ M (□), 500  $\mu$ M (△) and 1000  $\mu$ M (■). Other conditions were the same as in Fig. 2. \*,  $p<0.01$  and \*\*,  $p<0.05$  versus the initial perfusion of the control solution (time 0).

LVFX溶液を緩徐に注入した。LVFX 200, 500, 1000または2000 $\mu$ g注入には、それぞれ2, 5, 10または20mg/mlの濃度のLVFX溶液0.1mlを用いた。他眼にはオベガード<sup>®</sup> MA 0.1mlのみを同様の手技で注入した。各注入量について白色および有色ウサギ各5匹ずつ検討した。なお、注入後3時間のVEP記録後に眼底検査を行い、眼底に出血あるいは網膜剥離などの硝子体内注入による重篤な偶発症がないことを確認した。

### 3. 電気生理学的検査

ERGおよびVEP記録に際して、0.5%トロピカミドと0.5%塩酸フェニレフリン(ミドリン<sup>®</sup> P, 参天製薬)の点眼により瞳孔を十分に散大した。30分間の暗順応後に、ケタラール<sup>®</sup> 50(三共)およびセラクタール<sup>®</sup> 2%注射液(バイエル)の7:1の混合液0.5~1ml/kgの筋肉内注射<sup>20)</sup>によって全身麻酔を行い、ウサギ用に作製した筒型固定器にウサギを固定した。ERG用電

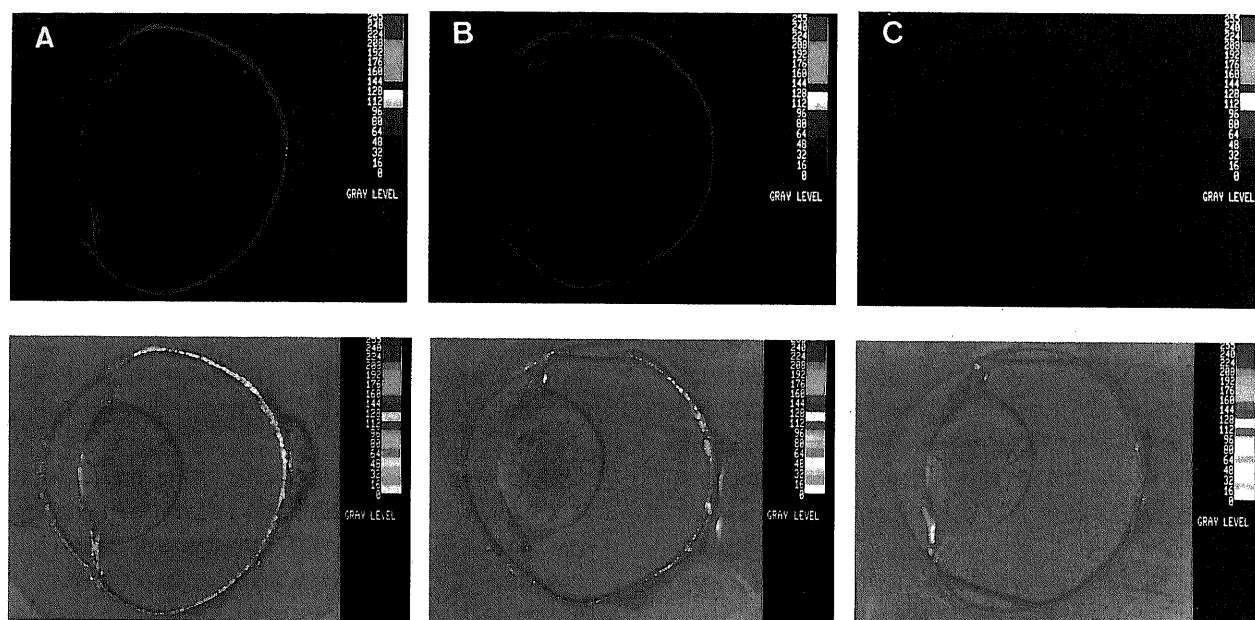


Fig. 11. Distribution of  $^{14}\text{C}$ -LVFX in the eye balls of albino rabbits at 1 hr (A), 2 hr (B) and 6 hr (C) after a single oral administration at a dose of 20 mg/kg. Upper row shows dark-field autoradiograms. Lower row shows autoradiograms superimposed on the images of eye balls. The radioactivity of the whole eye was much higher at 1 hr than at 2 or 6 hr after  $^{14}\text{C}$ -LVFX administration.

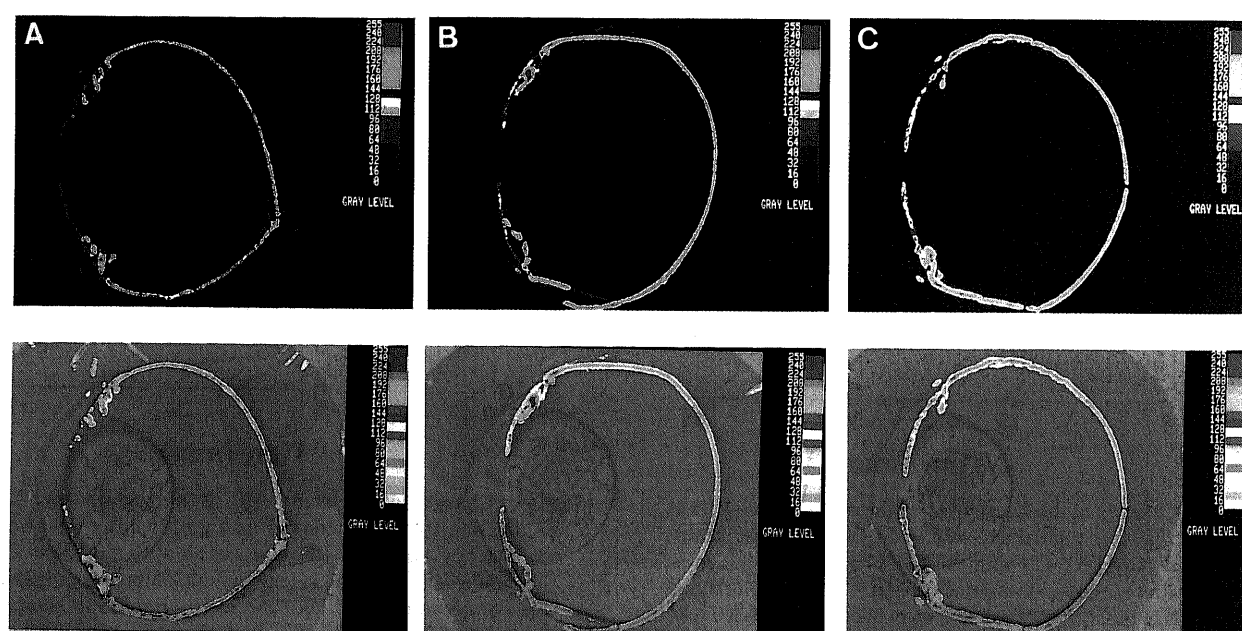


Fig. 12. Distribution of  $^{14}\text{C}$ -LVFX in the eye balls of pigmented rabbits at 1 hr (A), 2 hr (B) and 6 hr (C) after a single oral administration at a dose of 20 mg/kg. Other conditions were the same as in Fig. 11. The distribution was similar at 1, 2, and 6 hr after  $^{14}\text{C}$ -LVFX administration. High radioactivity was observed in the melanin-containing tissues (the iris, the ciliary body and the choroid-retina).

極には銀・塩化銀電極NT-614U (日本光電) を用いた。この電極を生理食塩水で満たした10ml注射筒の中に置き、注射筒の先端にシリコンチューブを接続した。このシリコンチューブの先端に充填した白綿が角膜輪部に接するように、チューブをウサギ用開眼器に取り付けた。不関電極にも同様の電極を使用し、剃毛した頭頂部皮膚正中線上に置いた。

光刺激にはIと同様にERG用光刺激装置 (三双製作所) を使用した。刺激光はレンズにて集光後にY字型の硝子繊維束を用いて両眼同時に送られた。硝子繊維束の射出端 (直径4mm) を両眼の角膜前方約1cmに置いた。これらの準備を8 luxの赤色光下で行なった。

角膜面照度5 lux, 持続時間5秒の単発矩形波光 (b波およびc波用) あるいは角膜面照度 $5 \times 10^3$  lux, 持続時間0.5秒, 刺激頻度1/3Hzの矩形波光 (a波, b波およびOP用) によって惹起されたERGを両眼同時に記録した。a波, b波およびOPの観察には, ERG電位を交流増幅器AB-622M (日本光電) で増幅し, FMデータレコーダーNFR-3515 (ソニー, 東京) に記録し, 応答加算平均装置ATAC-350 (日本光電) で10回加算平均した波形を写真撮影するとともに, ペンレコーダーWX4401 (グラフィック, 東京) で描出した。増幅器の時定数をa波およびb波では2秒, OPでは3ミリ秒とした。c波の観察には, ERG電位を直流増幅器RM-5 (日本光電) で増幅し, ペンレコーダーWX4401 (グラフィック) で描出した。

ERG記録終了後にVEPを両眼同時に記録した。VEP記録にはあらかじめ埋め込んでおいたVEP用関電極を用い, 不関電極には前頭部皮膚切創上に置いた銀・塩化銀電極NT-614U (日本光電) を使用した。なお左右眼それぞれの刺激によるVEP電位は, 対側のVEP用関電極で記録された。VEP電位を交流増幅器AB-622M (日本光電) で増幅した。増幅器の時定数を2秒とした。刺激光強度, 持続時間および刺激頻度はそれぞれ $5 \times 10^3$  lux (角膜面照度), 1秒および0.2Hzであった。

原則としてERGおよびVEP記録をLVFX硝子体内注入前, 注入後3時間, 2日, 1, 2および4週目に行った。

麻酔が安定している約1時間の間において, ウサギの体温は一定であった。本実験の1回の記録は1時間以内に終了したので, ERGおよびVEP記録中は体温を維持する装置を用いなかった。

「成績」に示すERGおよびVEP波形では上向きの振れは関電極側の陽性を意味する。ERGのa波, b波およびOP振幅の計測はIの摘出眼杯ERGと同様とした。ただしOPについてはO<sub>1</sub>からO<sub>3</sub>までの振幅を加算してOP振幅とした。またc波の振幅値を基線からc波の頂点までとした。

ウサギVEPには初期陽性応答と遅発性徐波がみられる。初期陽性応答では個体差が小さいが, 遅発性徐波は種々の要因によって変化しやすいとされる<sup>26)</sup>。したがって本研究ではVEPの初期陽性応答すなわち早期成分の頂点潜時を指標とした。

ERG波形は刺激および記録条件を一定に保っても記録時ごとの電極の位置, 電極と生体間の電気抵抗, 動物の全身状態などのわずかな違いによっても影響を受けうる<sup>25)~27)</sup>。またERGの日内変動や日差変動などの個体内変動を避けることはできない。このため長期間にわたる実験においてERGを反復して記録する際にERG波形に変化をきたしうる諸因子の影響を完全に排除することは不可能である。Lawwill<sup>28)</sup>はウサギERG (a波およびb波振幅) の日差変動を検討し, 同一眼の日差変動が左右眼の間での相違よりも大きいので, ウサギERG変化を長期にわたって観察するには片眼を被験眼とし他眼を対照として左右眼で比較することが適切であると報告した。ゆえに本研究では日内変動の影響をなるべく少なくするためにERG記録を1日のうちの一定時間帯 (午後2時~6時) に行ない, ERG変化については左右眼で比較検討を行なった。すなわち, 硝子体内注入前および注入後の各時点に記録した対照眼のa波, b波, c波およびOPの振幅または頂点潜時を100%として, 薬剤注入眼の

Table 1. Concentration of LVFX in the serum, the blood, the cerebrum, the cerebellum and the ocular tissues 2 hr after an oral administration of 20 mg/kg LVFX

| Tissues            | Concentration of LVFX<br>( $\bar{x} \pm SD$ , $\mu$ g/ml or $\mu$ g/g tissue) |                   |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|                    | Albino                                                                        | Pigmented         |
| Serum              | 3.78 $\pm$ 0.77                                                               | 4.40 $\pm$ 1.68   |
| Blood              | 3.53 $\pm$ 0.88                                                               | 3.93 $\pm$ 1.55   |
| Cerebrum           | 0.56 $\pm$ 0.18                                                               | 0.49 $\pm$ 0.15   |
| Cerebellum         | 0.57 $\pm$ 0.18                                                               | 0.40 $\pm$ 0.13   |
| Extraocular muscle | 4.02 $\pm$ 1.45                                                               | 4.05 $\pm$ 0.44   |
| Conjunctiva        | 2.43 $\pm$ 1.10                                                               | 1.15 $\pm$ 0.32   |
| Aqueous            | 0.77 $\pm$ 0.21                                                               | 0.57 $\pm$ 0.12   |
| Cornea             | 1.46 $\pm$ 0.49                                                               | 0.71 $\pm$ 0.27*  |
| Iris-ciliary body  | 1.30 $\pm$ 0.32                                                               | 14.08 $\pm$ 1.56* |
| Lens               | 0.11 $\pm$ 0.04                                                               | 0.06 $\pm$ 0.02   |
| Vitreous           | 0.43 $\pm$ 0.12                                                               | 0.41 $\pm$ 0.11   |
| Retina-choroid     | 1.72 $\pm$ 0.54                                                               |                   |
| Neural retina      |                                                                               | 0.68 $\pm$ 0.11   |
| RPE-choroid        |                                                                               | 30.56 $\pm$ 9.35* |
| Sclera             | 1.93 $\pm$ 0.56                                                               | 0.90 $\pm$ 0.72   |
| Optic nerve        | 1.71 $\pm$ 0.66                                                               | 0.93 $\pm$ 0.39*  |

RPE, retinal pigment epithelium.

\*,  $p < 0.05$  versus albino rabbit group.

振幅または頂点潜時を百分率 ( $100 \times$  薬剤注入眼の振幅または頂点潜時/対照眼の振幅または頂点潜時) で表示し、その平均値を硝子体内注入前と注入後の各時点で比較検討した。なお、振幅および頂点潜時の硝子体内注入前後の変化を Student の *t* 検定を用いて検定し、危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

#### 4. 眼底撮影および蛍光眼底造影

LVFX 2000  $\mu$ g 硝子体内注入を行った白色および有色ウサギ各 1 匹において、注入後 4 週目の VEP 記録後に眼底撮影および蛍光眼底造影を眼底カメラ TRC-W (トプコン、東京) を用いて行った。検査に先立ち、瞳孔をミドリン® P (参天製薬) の点眼により十分に散大した。蛍光眼底造影に際しては 10% フルオレセイン (フルオレサイト® 注射液 1 号, 日本アルコン、東京) (0.1mg/kg) をウサギ耳静脈から注射した。

#### 5. 組織学的検査

LVFX 200, 500, 1000 または 2000  $\mu$ g 注入後 4 週目の VEP 記録後に、白色および有色ウサギ各 20 匹をネプタール® (大日本製薬) 200mg の静脈内注射で屠殺し、直ちに眼球を摘出した。また一眼の硝子体内に LVFX 2000  $\mu$ g, 他眼にオベガード® MA 0.1ml を注入した白色および有色ウサギ各 3 匹から、注入 3 時間後に同様に眼球を摘出した。摘出眼球から前房水を 0.1ml 吸引排除し、摘出眼球の硝子体内に 3% GA 液 0.2ml を注入した。摘出眼球を 3% GA 液に 1 時間浸漬した後に、眼球を上下に水平に二分し、視神経の付着側を光学顕微鏡 (光顕) 用標本, 他側を電子顕微鏡 (電顕) 用標本とした。光顕用標本ではダビッドソン固定液 (95% エタノール: ホルマリン: 酢酸: 蒸留水 = 3: 2: 1: 2) に約 3 時間浸漬した後に、エタノール系列にて脱水した。ついでパラフィン包埋を行い、HE 染色を施して観察した。電顕用標本では 3% GA 液で固定し、2% リン酸緩衝オスミウム酸で二重固定した。ついで、クエトール 812 (日新 EM, 東京) で包埋した後に、酢酸ウラニウム・クエン酸鉛で染色し透過型電子顕微鏡 H-500 (日立、東京) で観察した。なお光顕用標本では後極部および周辺部を観察した。電顕用標本では後極部付近および鼻側ならびに耳側周辺部網膜それぞれについて  $5 \times 5$  mm の範囲を観察した。

#### IV. LVFX 硝子体内注入後の眼各組織における検出

##### 1. 実験動物、使用薬剤および注入薬剤濃度

体重 2~3kg の白色ウサギ 30 匹および有色ウサギ 35 匹を使用した。各ウサギには、ウサギ用固型飼料 RM-3 (船橋農場) を与え、水を自由に摂取させ、予備飼育を 1 週間以上行った。

標識化合物として  $^{14}$ C-LVFX (第一製薬) を使用した。その比放射能は 2.88MBq/mg で、II-2 と同様の方法で測定した放射化学的純度は 97% 以上であった。測定感度を考慮して、 $^{14}$ C-LVFX に非標識 LVFX (第一製薬) を比放射能が  $0.185$ MBq/mg となるように加えた。混合した薬剤を人工眼内灌流液 (オベガード® MA) に溶解し、LVFX として 5mg/ml の濃度に調整した。

##### 2. 硝子体内注入法

片眼の硝子体内に  $^{14}$ C-LVFX 500  $\mu$ g を含む 0.1ml のオベガード® MA 溶液を緩徐に注入した。注入法は III-2 と同様であった。他眼は無処置とした。

##### 3. 試料の採取および処理法ならびに LVFX 濃度測定法

白色ウサギでは硝子体内注入後 6, 12, 24, 48, 72 時間および 1 週間、有色ウサギでは硝子体内注入後 6, 12, 24, 48, 72 時間, 1 週間および 4 週間の各時点でそれぞれ 5 匹をネプタール

ル® (大日本製薬) 200mg の静脈内注射で屠殺し、直ちに両眼球を摘出した。ほぼ同時に心腔内より約 2ml の動脈血を採取した。さらに頭蓋骨を除去して両側の視神経を採取した。摘出眼球から前房水を約 0.2ml 採取した後に実体顕微鏡 SMZ-2T (ニコン) 下で結膜, 角膜, 虹彩毛様体, 水晶体, 硝子体, 神経網膜, 網膜色素上皮・脈絡膜および強膜の各組織に分割した (非固定法)。採取した血液および各組織を組織燃焼用濾紙カップ K-ASC-11 (東洋濾紙) に入れ、湿重量を測定した。各試料を 48 時間以上乾燥させた後に、III-3 と同様に組織自動燃焼装置 ASC-113 (ALOKA) で燃焼し、放射能測定に供した。各試料中の放射能を液体シンチレーションカウンター LSC-1000 (ALOKA) で 1 分間計数した。計数効率の補正は外部線源によるチャンネル比法によった。得られた値から各試料内放射能濃度を求めた。さらに放射能濃度を LVFX 濃度に換算し、LVFX 濃度を白色および有色ウサギ 5 匹の平均値  $\pm$  標準偏差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) で表示した。放射能の検出限界はバックグランド値 (dpm) の 2 倍とした。検出限界以下の放射能濃度は 0 として LVFX 濃度の平均値を算出し、その値が各組織の湿重量とバックグランド値 (dpm) の 2 倍値から算出した各組織の測定限界値 (結膜で  $0.16 \mu$ g/g, 前房水

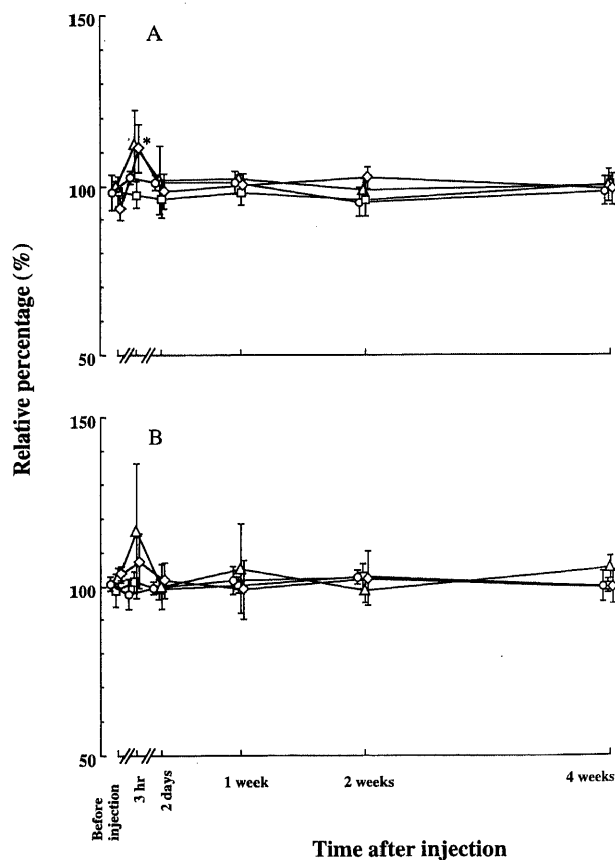


Fig. 13. Changes of the amplitude of the b-wave induced by an intravitreal injection of LVFX in albino (A) and pigmented rabbits (B). The dosage of LVFX was 200  $\mu$ g (○), 500  $\mu$ g (□), 1000  $\mu$ g (△) and 2000  $\mu$ g (◇). The percentages of the amplitudes in the tested eye to those in the control fellow eye, (tested eye/control fellow eye)  $\times$  100 (%), were plotted against time before and after injection. Stimulus intensity was 5 lux at the cornea. Each data point shows the  $\bar{x} \pm SD$ . \*,  $p < 0.01$  versus before injection.

で $0.02\mu\text{g/ml}$ 、角膜で $0.09\mu\text{g/g}$ 、虹彩毛様体で $0.08\mu\text{g/g}$ 、水晶体で $0.01\mu\text{g/g}$ 、硝子体で $0.01\mu\text{g/ml}$ 、神経網膜で $0.06\mu\text{g/g}$ 、網膜色素上皮・脈絡膜で $0.10\mu\text{g/g}$ 、強膜で $0.06\mu\text{g/g}$ 、視神経で $0.30\mu\text{g/g}$ および血液で $0.01\mu\text{g/ml}$ 未満の場合をNDと表示した。2群間の有意差検定にはWilcoxon順位検定を用い、危

険率5%未満を有意差ありと判定した。

#### V. 神経網膜、網膜色素上皮および強膜の分離方法

##### 1. GA処理法によるLVFX濃度測定

体重2~3kgの有色ウサギ10匹を使用した。ウサギの予備飼育法、使用薬剤および硝子体内注入法はIVと同様であった。硝

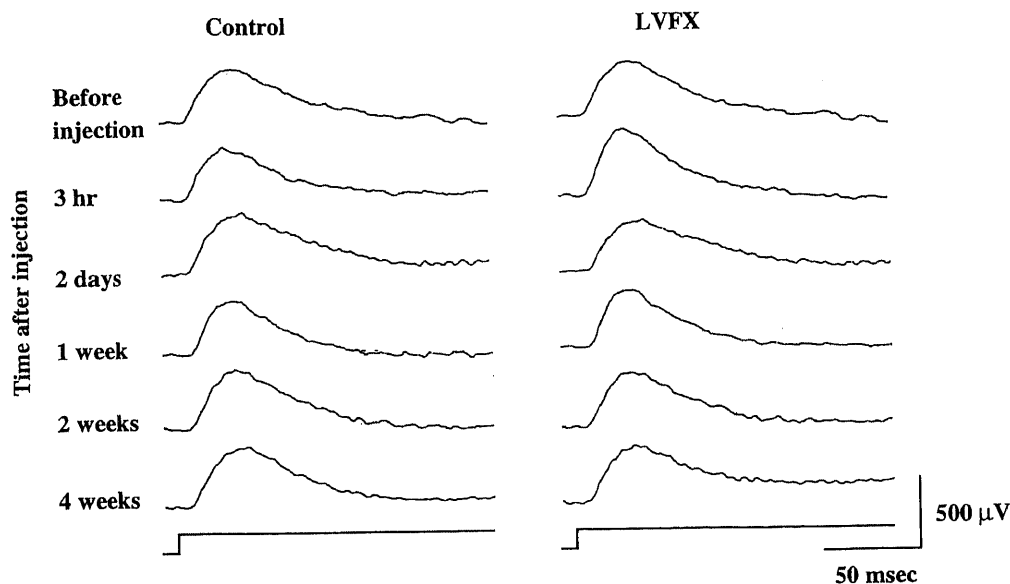


Fig.14. Effects of an intravitreal injection of  $2000\mu\text{g}$  LVFX on the ERG of an albino rabbit. The amplitude of the b-wave was increased 3 hr after injection. The b-wave recovered within 2 days. The right and left tracings show the responses from the LVFX-injected eye and the control fellow eye, respectively. Amplifier time constant was 2 sec. Stimulus intensity was 5 lux at the cornea.

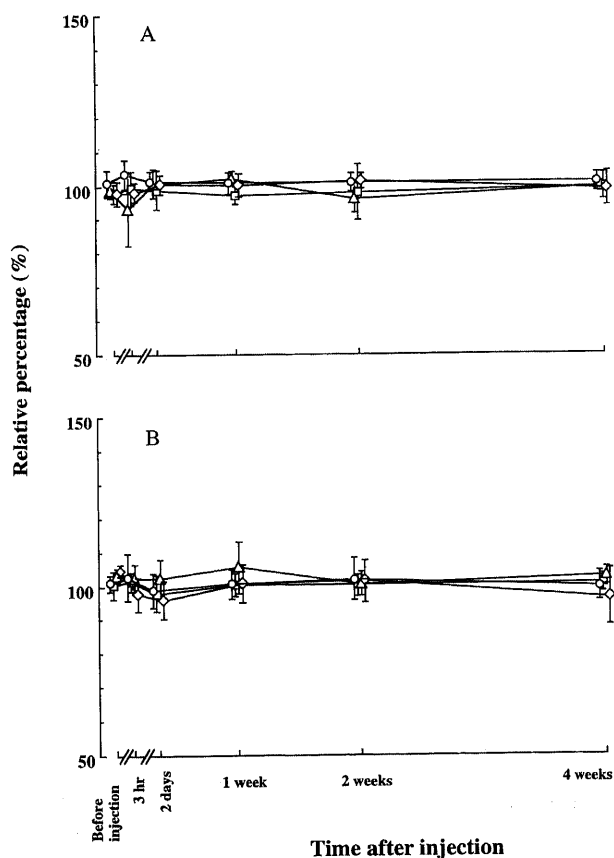


Fig. 15. Changes of the amplitude of the c-wave induced by an intravitreal injection of LVFX in albino (A) and pigmented rabbits (B). The dosage of LVFX was  $200\mu\text{g}$  (○),  $500\mu\text{g}$  (□),  $1000\mu\text{g}$  (△) and  $2000\mu\text{g}$  (◇). The percentages of the amplitudes in the tested eye to those in the control fellow eye, (tested eye/control fellow eye)  $\times 100$  (%), were plotted against time before and after injection. Stimulus intensity was 5 lux at the cornea. Stimulus duration was 5 sec. Each data point shows the  $\bar{x} \pm \text{SD}$ .

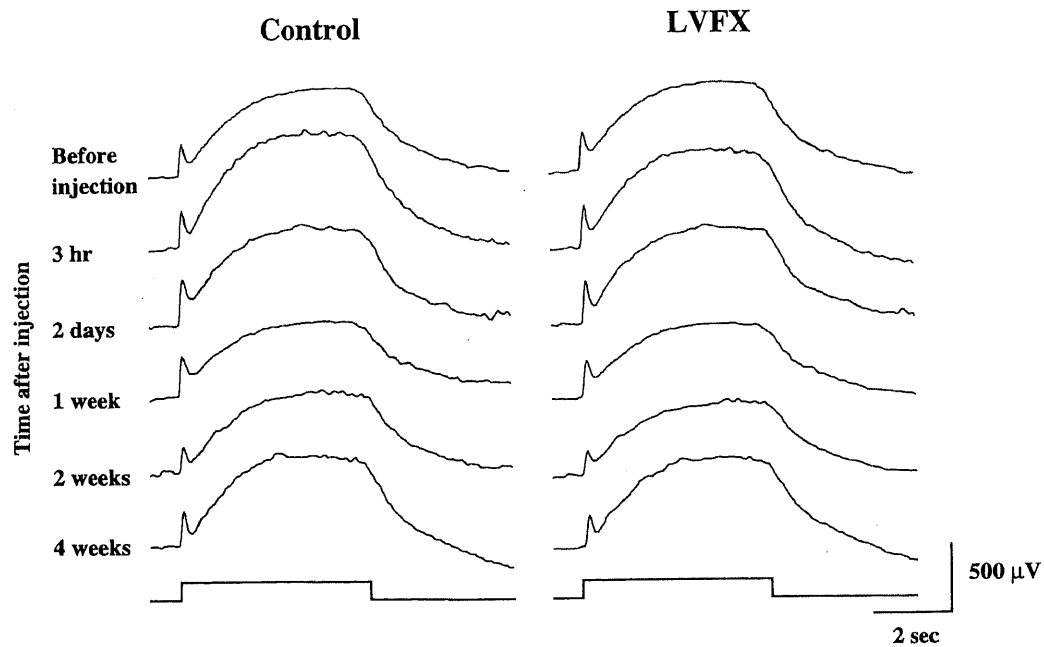


Fig. 16. Effects of an intravitreal injection of  $2000 \mu\text{g}$  LVFX on the ERG of a pigmented rabbit. The b- and c-waves were not deteriorated throughout the follow-up period up to 4 weeks. The right and left tracings show the responses from the LVFX-injected eye and the control fellow eye, respectively. Direct-coupled amplification. Stimulus intensity was 5 lux at the cornea. Stimulus duration was 5 sec.

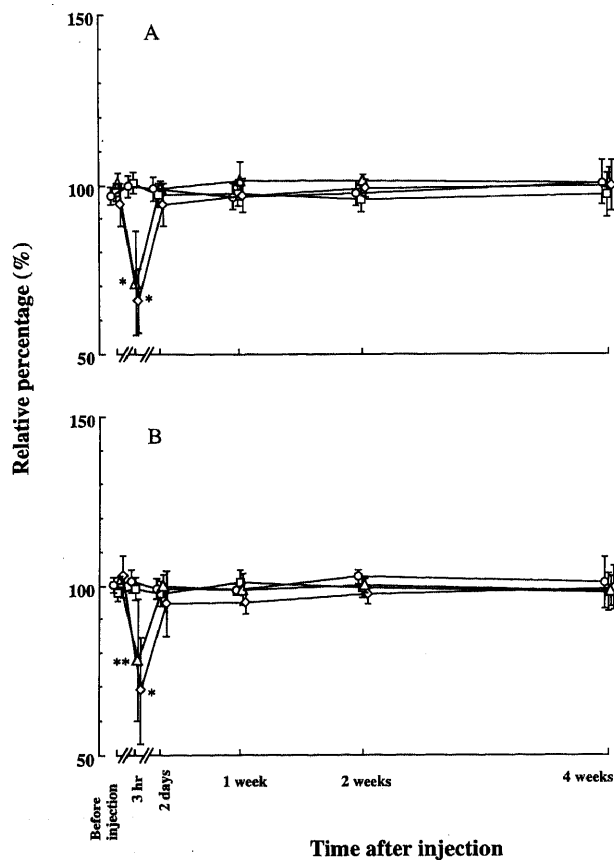


Fig. 17. Changes of the amplitude of the oscillatory potential ( $O_1+O_2+O_3$ ) induced by an intravitreal injection of LVFX in albino (A) and pigmented rabbits (B). The dosage of LVFX was  $200 \mu\text{g}$  (○),  $500 \mu\text{g}$  (□),  $1000 \mu\text{g}$  (△) and  $2000 \mu\text{g}$  (◇). The percentages of the amplitudes in the tested eye to those in the control fellow eye, (tested eye/control fellow eye)  $\times 100$  (%), were plotted against time before and after injection. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea. Each data point shows the  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*,  $p < 0.01$  and \*\*,  $p < 0.05$  versus before injection.

子体内注入後6時間および1週の各時点でⅣと同様に<sup>14</sup>C-LVFXを注入した眼球を摘出した。摘出眼球を角膜輪部に沿って切開し、眼球前半部および硝子体をできる限り除去した後に、網膜・脈絡膜・強膜部を10mlの3% GA液に1~2分間浸漬し固定した。固定された組織を実体顕微鏡SMZ-2T (ニコン) 下で神経網膜、網膜色素上皮・脈絡膜および強膜に分離し、Ⅳ-3と同様の方法でLVFX濃度を測定した (GA処理法)。

測定したLVFX濃度をⅣで測定した有色ウサギの注入後6時間および1週間の値 (非固定法) とそれぞれ比較検討した。2群間の有意差検定にはWilcoxon順位和検定を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

## 2. 神経網膜、網膜色素上皮および強膜の分離

有色ウサギ2匹を使用した。1匹はⅣ-2と同様に無処置で神経網膜、網膜色素上皮・脈絡膜および強膜に分離した (非固定法)。他の1匹はⅤ-1と同様のGA処理法を用いて神経網膜、網膜色素上皮・脈絡膜および強膜に分離した。それぞれの組織をⅢ-5の光顕用標本と同様の方法で固定し、各組織の分離程度を光顕にて観察した。

## 3. 湿重量変化

注入後6時間の時点で摘出した眼球の5眼中4眼については、網膜・脈絡膜・強膜部の湿重量を3% GA液に固定する前後で測定し、固定前の湿重量を100%として固定後の湿重量の百分率 ( $100 \times \text{固定後の湿重量} / \text{固定前の湿重量}$ ) を算出し、その平均値±標準偏差 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) で表示した。

## 4. LVFXのGA液への漏出量の算出

注入後6時間に摘出した眼球の5眼中4眼で使用したGA液

0.1mlのLVFX濃度をⅣ-3と同様に測定し、その濃度からGA液10ml中に漏出したLVFX量を算出した。神経網膜内LVFX濃度とその湿重量から神経網膜内LVFX量 (神経網膜内LVFX濃度  $\times$  神経網膜の湿重量) を算出した。同様に網膜色素上皮・脈絡膜および強膜内LVFX量も算出した。神経網膜、網膜色素上皮・脈絡膜、強膜およびGA液中LVFX量から、LVFXの漏出率  $\{100 \times \text{GA液中LVFX量} / (\text{神経網膜内LVFX量} + \text{網膜色素上皮・脈絡膜内LVFX量} + \text{強膜内LVFX量} + \text{GA液中LVFX量})\}$  を算出し、その平均値±標準偏差 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) で表示した。

## 成 績

### 1. 摘出眼杯 ERG における検討

#### 1. a波におよぼす影響

LVFXおよびDR-3354のいずれの濃度の灌流においてもa波振幅に有意な変化はなかった。LVFXの100, 300および500 $\mu$ M灌流およびDR-3354のいずれの濃度の灌流においてもa波頂点潜時に有意な変化はなかったが、LVFXの1000 $\mu$ M灌流15分後にa波頂点潜時が有意に延長した ( $p < 0.01$ )。a波頂点潜時の延長は対照液の再灌流15分後には回復し、可逆的であった (図1, 2)。

#### 2. b波におよぼす影響

LVFXの100, 300および500 $\mu$ M灌流においてb波振幅に有意な変化はなかったが、1000 $\mu$ M灌流においてb波振幅の有意な低下がみられた ( $p < 0.01$ )。b波振幅の低下は対照液の再灌流後も続き、非可逆的な変化であった。DR-3354の100および300 $\mu$ M灌流においてb波振幅に有意な変化はなかったが、500

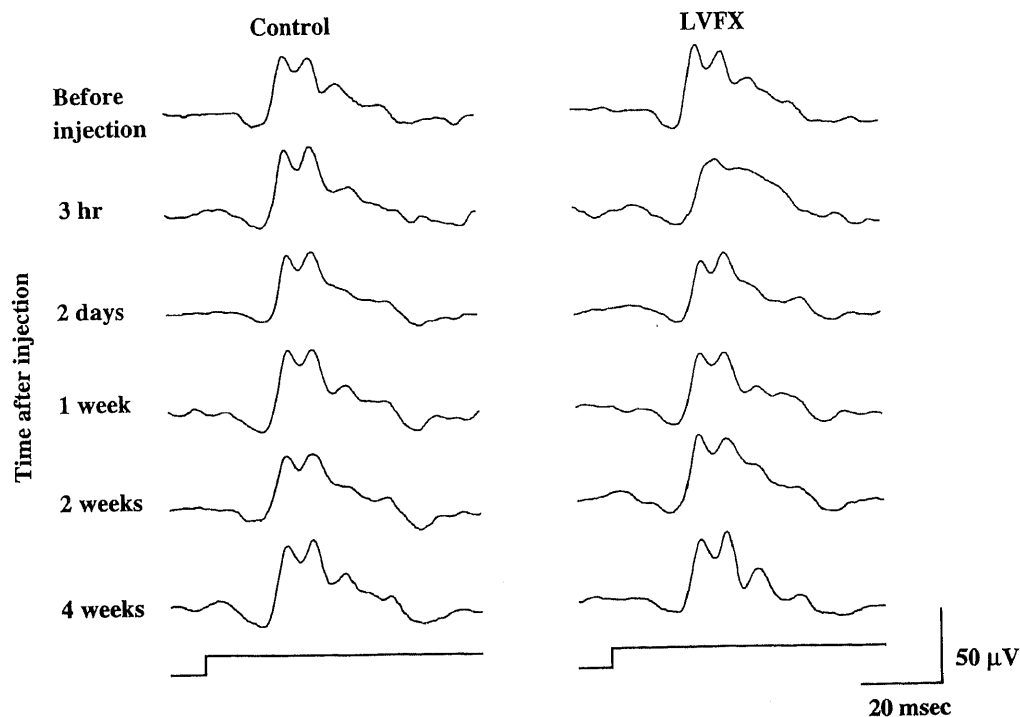


Fig. 18. Effects of an intravitreal injection of 2000  $\mu$ g LVFX on the oscillatory potential of a pigmented rabbit. The right and left tracings show the responses from the LVFX-injected eye and the control fellow eye, respectively. The amplitude of oscillatory potential was significantly decreased 3 hr after injection. The oscillatory potential recovered within 2 days. Each trace shows the averaged waveform of 10 responses. Amplifier time constant was 3 msec. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea. Stimulus frequency was 1/3 Hz. Stimulus duration was 500 msec.

および1000 $\mu$ M灌流においてb波振幅の有意な低下がみられた(500 $\mu$ M灌流では $p < 0.05$ , 1000 $\mu$ M灌流では $p < 0.01$ ). b波振幅の低下は対照液の再灌流後に軽減し, 変化はほぼ可逆的であった(図3~8).

### 3. OPにおよぼす影響

LVFXの100および300 $\mu$ M灌流においてOP振幅に有意な変化はなかったが, 500および1000 $\mu$ M灌流においてOP振幅の有意な低下がみられた( $p < 0.01$ ). OP振幅の低下は濃度依存的であった. DR-3354の100 $\mu$ M灌流においてOP振幅に有意な変化はなかったが, 300, 500および1000 $\mu$ M灌流においてOP振幅の有意な低下がみられた(500 $\mu$ M灌流では $p < 0.05$ , 300 $\mu$ M灌流および1000 $\mu$ M灌流では $p < 0.01$ ). またOP頂点潜時( $O_s$ )はLVFXの1000 $\mu$ M灌流で有意に延長した( $p < 0.01$ )(図5~10).

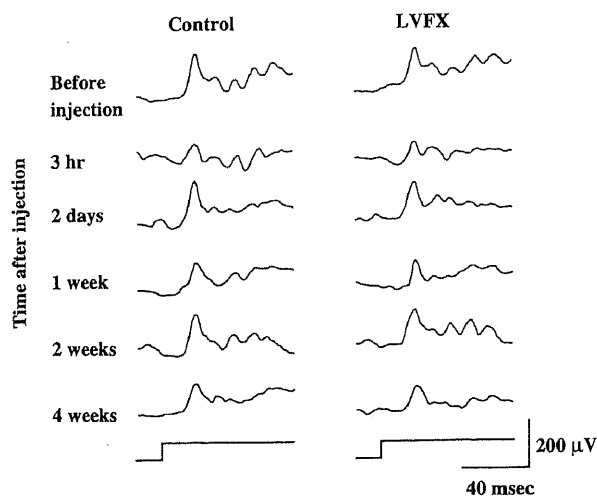


Fig. 19. Effects of an intravitreal injection of 2000  $\mu$ g LVFX on the visually evoked potential (VEP) of a pigmented rabbit. The right and left tracings show the responses from the LVFX-injected eye and the control fellow eye, respectively. The initial positive response of the VEP remained unchanged 4 weeks after injection. Amplifier time constant was 2 sec. Stimulus intensity was  $5 \times 10^3$  lux at the cornea. Stimulus duration was 1 sec. Upward deflection indicates positivity of the electrode on the dura mater.

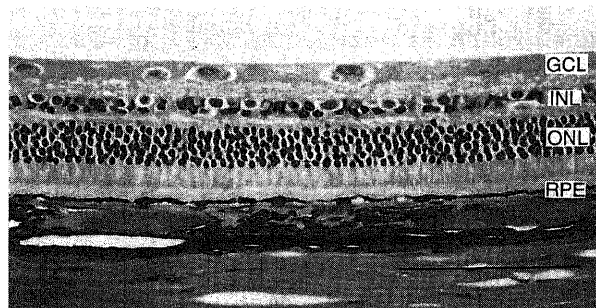


Fig. 20. Light micrograph of the retina of a pigmented rabbit 4 weeks after an intravitreal injection of 2000  $\mu$ g LVFX. No abnormal changes were observed. HE stain. Bar indicates 100  $\mu$ m. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium.

## II. 経口投与後の眼内移行

### 1. 眼球のオートラジオグラフィー

白色ウサギへの $^{14}$ C-LVFX経口投与1時間後では, 網脈絡膜・強膜および虹彩毛様体において高い放射能が検出された. 角膜および前房水には低い放射能しか検出されず, 水晶体および硝子体には放射能は検出されなかった. 投与2時間後では眼球全体の放射能は低下したが, 投与1時間後とほぼ同様の分布を示した. 投与6時間後では眼球全体の放射能はさらに低下し, 網脈絡膜・強膜, 角膜および前房水において低い放射能が検出されたが, 虹彩毛様体には痕跡程度の放射能しか検出されなかった. 水晶体および硝子体にはいずれの測定時点においても放射能は検出されなかった(図11).

有色ウサギへの $^{14}$ C-LVFX経口投与1時間後では, 虹彩毛様体および網脈絡膜・強膜において高い放射能が検出された. 角膜および前房水には低い放射能しか検出されず, 水晶体および硝子体には放射能は検出されなかった. 投与2時間後では眼球全体の放射能はやや上昇したが, 放射能分布は1時間後と同様であった. 投与6時間後における眼球全体の放射能は2時間後に比しほとんど低下せず, その放射能分布も2時間後とほぼ同様であった(図12).

### 2. 経口投与2時間後の組織内LVFX濃度

白色および有色ウサギへの $^{14}$ C-LVFX経口投与2時間後の組織内LVFX濃度を表1に示す. 白色および有色ウサギにおける血清中LVFX濃度はそれぞれ $3.78 \pm 0.77 \mu\text{g/ml}$ および $4.40 \pm 1.68 \mu\text{g/ml}$ であった. 血清中LVFX濃度には白色ウサギと有色ウサギとの間で有意差はなかった. 白色および有色ウサギにおける硝子体内LVFX濃度はそれぞれ $0.43 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ および $0.41 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ で, 白色および有色ウサギにおけるそれぞれの血清中濃度に対する硝子体内濃度の比はそれぞれ約11%お

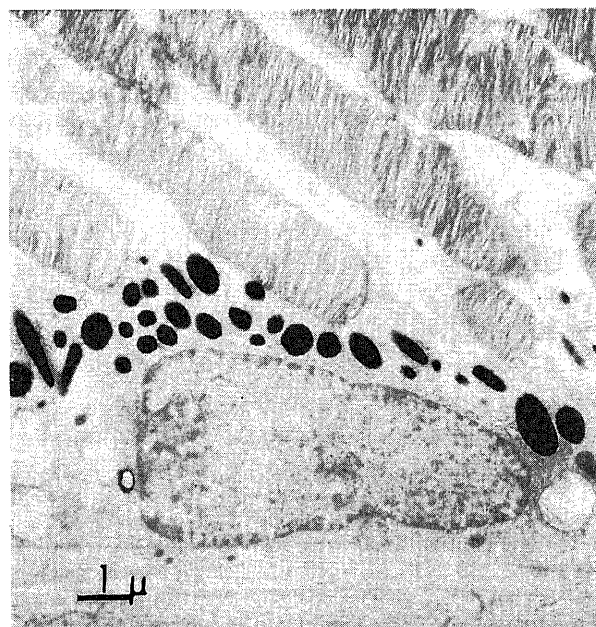


Fig. 21. Electron micrograph of the retina of a pigmented rabbit 4 weeks after an intravitreal injection of 2000  $\mu$ g LVFX. No abnormal changes were observed. Uranyl acetate and lead citrate stain. Bar indicates 1  $\mu$ m.

よび9%であった。白色および有色ウサギにおける前房水内LVFX濃度はそれぞれ $0.77 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ および $0.57 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ で、白色および有色ウサギにおけるそれぞれの血清中濃度に対する前房水内濃度の比はそれぞれ約20%および13%であった。硝子体内および前房水内LVFX濃度には白色ウサギと有色ウサギとの間で有意差はなかった。

結膜、強膜および水晶体内LVFX濃度についても、前房水や硝子体と同様で、白色ウサギと有色ウサギとの間で有意差はなかった。水晶体内LVFX濃度は白色および有色ウサギにおいてそれぞれ $0.11 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ および $0.06 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ で血清中濃度に対する比は約3%および1%であり、LVFXは水晶体にはほとんど移行しなかった。

角膜および視神経内LVFX濃度は有色ウサギに比し白色ウサギで有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

これに対して、虹彩毛様体内LVFX濃度は白色および有色ウサギにおいてそれぞれ $1.30 \pm 0.32 \mu\text{g/g}$ および $14.08 \pm 1.56 \mu\text{g/g}$ であり、白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高かった ( $p < 0.05$ )。網脈絡膜でも同様で、白色ウサギでは網脈絡膜内LVFX濃度は $1.72 \pm 0.54 \mu\text{g/g}$ 、有色ウサギでは網脈絡膜色素上皮・脈絡膜内LVFX濃度は $30.56 \pm 9.35 \mu\text{g/g}$ であり、LVFX濃度は白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高かった ( $p < 0.05$ )。虹彩毛様体および網脈絡膜内濃度の血清中濃度に対する比は白色ウサギではそれぞれ約34%および45%であったが、有色ウサギでははるかに高くそれぞれ約320および695%であり、有色ウサギでは血清中濃度をはるかに越える濃度のLVFXがメラニン含

有眼組織内に移行していた。中枢神経(大脳および小脳)内LVFX濃度に対する血清中濃度の比は白色および有色ウサギともに9~15%であった。

### Ⅲ. 硝子体内注入の網膜におよぼす影響

#### 1. 電気生理学的検討

##### 1) a波におよぼす影響

a波振幅および頂点潜時には白色および有色ウサギともにいずれの注入量においても明らかな変化はなかった。

##### 2) b波におよぼす影響

白色および有色ウサギともに200および500 $\mu\text{g}$ 注入ではb波振幅に変化はなかった(図13)。白色ウサギにおいては1000 $\mu\text{g}$ 、有色ウサギにおいては1000および2000 $\mu\text{g}$ 注入で、注入3時間後にb波振幅の増大傾向がみられたが、有意な変化ではなかった。白色ウサギにおいて2000 $\mu\text{g}$ 注入3時間後にb波振幅は有意に増大した ( $p < 0.01$ ) (図13, 14)。1000および2000 $\mu\text{g}$ 注入におけるb波振幅の変化は注入2日後までに回復した(図13)。b波頂点潜時にはいずれの注入量においても明らかな変化はなかった。

##### 3) c波におよぼす影響

c波振幅には白色および有色ウサギともにいずれの注入量においても明らかな変化はなかった(図15, 16)。

##### 4) OPにおよぼす影響

OP振幅および $\text{O}_2$ 潜時には白色および有色ウサギともに200および500 $\mu\text{g}$ 注入では変化はなかった(図17)。白色および有色ウサギともに1000および2000 $\mu\text{g}$ 注入では注入3時間後に有意

Table 2. Concentration of LVFX in the ocular tissues and the blood after an intravitreal injection of 500  $\mu\text{g}$  of LVFX in albino rabbits

| Tissues           | Concentration of LVFX ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ , $\mu\text{g/ml}$ or $\mu\text{g/g}$ tissue) |                  |                 |                 |                 |                 |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                   | Time after injection                                                                          |                  |                 |                 |                 |                 |
|                   | 6 hr                                                                                          | 12 hr            | 24 hr           | 48 hr           | 72 hr           | 1 week          |
| Injected eye      |                                                                                               |                  |                 |                 |                 |                 |
| Conjunctiva       | $4.66 \pm 5.31$                                                                               | $0.54 \pm 0.46$  | $0.76 \pm 0.99$ | $0.34 \pm 0.52$ | ND              | ND              |
| Aqueous           | $1.68 \pm 0.73$                                                                               | $0.72 \pm 0.42$  | $0.47 \pm 0.18$ | $0.13 \pm 0.08$ | $0.09 \pm 0.04$ | ND              |
| Cornea            | $3.02 \pm 1.39$                                                                               | $2.50 \pm 0.60$  | $1.23 \pm 0.24$ | $0.68 \pm 0.25$ | $0.48 \pm 0.33$ | $0.10 \pm 0.07$ |
| Iris-ciliary body | $15.60 \pm 5.66$                                                                              | $4.20 \pm 1.26$  | $0.85 \pm 0.21$ | $0.23 \pm 0.05$ | $0.49 \pm 0.59$ | ND              |
| Lens              | $18.81 \pm 4.79$                                                                              | $9.85 \pm 5.69$  | $4.38 \pm 2.48$ | $2.07 \pm 0.34$ | $1.56 \pm 0.34$ | $0.28 \pm 0.10$ |
| Vitreous          | $58.80 \pm 12.71$                                                                             | $13.61 \pm 1.89$ | $2.22 \pm 0.92$ | $0.53 \pm 0.18$ | $0.29 \pm 0.10$ | $0.03 \pm 0.01$ |
| Neural retina     | $41.71 \pm 3.89$                                                                              | $8.77 \pm 0.87$  | $1.20 \pm 0.15$ | $0.35 \pm 0.08$ | $0.50 \pm 0.35$ | ND              |
| RPE-choroid       | $17.86 \pm 1.48$                                                                              | $4.68 \pm 1.15$  | $0.73 \pm 0.16$ | $0.41 \pm 0.39$ | $0.15 \pm 0.28$ | ND              |
| Sclera            | $9.95 \pm 0.88$                                                                               | $4.16 \pm 1.19$  | $0.56 \pm 0.13$ | $0.75 \pm 1.08$ | $1.02 \pm 1.81$ | ND              |
| Optic nerve       | $1.23 \pm 0.14$                                                                               | $0.40 \pm 0.16$  | ND              | ND              | ND              | ND              |
| Fellow eye        |                                                                                               |                  |                 |                 |                 |                 |
| Conjunctiva       | $0.29 \pm 0.22$                                                                               | ND               | ND              | ND              | ND              | ND              |
| Aqueous           | $0.11 \pm 0.10$                                                                               | $0.03 \pm 0.11$  | ND              | ND              | ND              | ND              |
| Cornea            | $0.17 \pm 0.05$                                                                               | $0.13 \pm 0.11$  | ND              | ND              | ND              | ND              |
| Iris-ciliary body | $0.33 \pm 0.42$                                                                               | ND               | ND              | ND              | ND              | ND              |
| Lens              | $0.12 \pm 0.09$                                                                               | $0.06 \pm 0.09$  | $0.04 \pm 0.09$ | $0.02 \pm 0.03$ | ND              | ND              |
| Vitreous          | $0.17 \pm 0.22$                                                                               | $0.01 \pm 0.01$  | $0.03 \pm 0.22$ | $0.03 \pm 0.05$ | ND              | ND              |
| Neural retina     | $0.21 \pm 0.11$                                                                               | ND               | ND              | ND              | ND              | ND              |
| RPE-choroid       | $1.55 \pm 2.35$                                                                               | ND               | ND              | ND              | ND              | ND              |
| Sclera            | $0.17 \pm 0.15$                                                                               | ND               | ND              | ND              | ND              | ND              |
| Optic nerve       | ND                                                                                            | ND               | ND              | ND              | ND              | ND              |
| Blood             | $0.15 \pm 0.14$                                                                               | $0.03 \pm 0.02$  | $0.03 \pm 0.02$ | $0.04 \pm 0.04$ | $0.02 \pm 0.05$ | ND              |

RPE, retinal pigment epithelium. ND, not detectable.

なOP振幅の低下(有色ウサギにおける1000 $\mu$ g注入では $p < 0.05$ , 白色ウサギにおける1000および2000 $\mu$ g注入および有色ウサギにおける2000 $\mu$ g注入では $p < 0.01$ )ならびに $O_2$ 潜時の延長傾向がみられた。これらの変化は2日目までには回復した(図17, 18)。

#### 5) VEP早期成分の頂点潜時におよぼす影響

VEP早期成分の頂点潜時には白色および有色ウサギともにいずれの注入量においても対照眼刺激とLVFX注入眼刺激の間に有意差はなかった(図19)。

#### 2. 眼底撮影および蛍光眼底造影検査

白色および有色ウサギともに異常所見はなかった。

#### 3. 組織学的検討

光顕的検討では、いずれの注入量においてもLVFX注入後3時間および4週間で白色ウサギ(23匹)および有色ウサギ(23匹)ともに網膜に明らかな変化はなかった(図20)。電顕的検討においても光顕的検討と同様に網膜に明らかな変化はなかった(図21)。

#### IV. 硝子体内注入後の眼内動態

白色ウサギへのLVFX 500 $\mu$ g硝子体内注入後の眼内および血液中LVFX濃度を表2に示す。注入眼における硝子体内LVFX濃度は、注入6時間後において $58.80 \pm 12.71 \mu\text{g/ml}$ , 12時間後で $13.61 \pm 1.89 \mu\text{g/ml}$ , 24時間後で $2.22 \pm 0.92 \mu\text{g/ml}$ と注入24時間後まで急速に減少した。その後は減少速度が低下し, 48時間後に $0.53 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ , 72時間後に $0.29 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ , 1週後に $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ のLVFXが検出された(図22)。

注入後24時間までの硝子体内半減期は約4.4時間であった(図22)。虹彩毛様体(図23), 神経網膜(図24)および網膜色素上皮・脈絡膜(図25)内LVFX濃度もほぼ同様の推移を示した。前房水, 角膜および水晶体内LVFX濃度はいずれもほぼ指数関数的に減少した。

LVFX非注入眼では視神経以外の測定したすべての組織でいずれも微量であるがLVFXが検出され, 他眼への移行がみられた。血液中にも微量のLVFXが検出された。

有色ウサギへのLVFX 500 $\mu$ g硝子体内注入後の眼内および血液中LVFX濃度を表3に示す。注入眼における硝子体内LVFX濃度は、注入6時間後において $63.37 \pm 12.65 \mu\text{g/ml}$ , 12時間後で $12.51 \pm 5.06 \mu\text{g/ml}$ , 24時間後で $2.42 \pm 0.34 \mu\text{g/ml}$ , 48時間後で $0.64 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ , 72時間後で $0.32 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ , 1週後で $0.07 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ と白色ウサギとほぼ同様の推移を示した(図22)。注入後24時間までの硝子体内半減期は約4.3時間であった(図22)。また4週後においても硝子体内に $0.03 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ のLVFXが検出された。また前房水, 角膜および水晶体内LVFX濃度の推移もほぼ白色ウサギと同様であった。これに対して有色ウサギの虹彩毛様体(図23), 神経網膜(図24), 網膜色素上皮・脈絡膜(図25)内LVFX濃度およびその推移は白色ウサギとは明らかに異なっていた。すなわち虹彩毛様体, 神経網膜および網膜色素上皮・脈絡膜内LVFX濃度は, 測定したいずれの時点においても白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高かった( $p < 0.01$ )。注入1週後では白色ウサギの虹彩毛様体, 神経網膜および網膜色素上皮・脈絡膜の各組織においてLVFXは検出さ

Table 3. Concentration of LVFX in the ocular tissues and the blood after an intravitreal injection of 500  $\mu$ g of LVFX in pigmented rabbits

| Tissues           | Concentration of LVFX ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ , $\mu\text{g/ml}$ or $\mu\text{g/g}$ tissue) |                   |                   |                   |                   |                  |                 |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|
|                   | Time after injection                                                                          |                   |                   |                   |                   |                  |                 |
|                   | 6 hr                                                                                          | 12 hr             | 24 hr             | 48 hr             | 72 hr             | 1 week           | 4 weeks         |
| Injected eye      |                                                                                               |                   |                   |                   |                   |                  |                 |
| Conjunctiva       | $0.77 \pm 1.02$                                                                               | $1.23 \pm 2.19$   | ND                | ND                | ND                | ND               | ND              |
| Aqueous           | $1.16 \pm 0.46$                                                                               | $0.76 \pm 0.23$   | $0.37 \pm 0.11$   | $0.33 \pm 0.31$   | $0.08 \pm 0.01$   | ND               | ND              |
| Cornea            | $1.87 \pm 0.52$                                                                               | $1.93 \pm 0.51$   | $1.19 \pm 0.46$   | $1.20 \pm 0.66$   | $0.46 \pm 0.10$   | $0.12 \pm 0.12$  | ND              |
| Iris-ciliary body | $38.03 \pm 6.18$                                                                              | $26.56 \pm 12.59$ | $25.31 \pm 10.57$ | $16.86 \pm 7.33$  | $16.80 \pm 4.37$  | $5.74 \pm 2.23$  | $1.84 \pm 0.42$ |
| Lens              | $15.84 \pm 1.92$                                                                              | $9.48 \pm 1.35$   | $3.90 \pm 1.01$   | $2.41 \pm 0.44$   | $1.64 \pm 0.30$   | $0.25 \pm 0.11$  | $0.02 \pm 0.02$ |
| Vitreous          | $63.37 \pm 12.65$                                                                             | $12.51 \pm 5.06$  | $2.42 \pm 0.34$   | $0.64 \pm 0.07$   | $0.32 \pm 0.11$   | $0.07 \pm 0.06$  | $0.03 \pm 0.05$ |
| Neural retina     | $66.91 \pm 5.20$                                                                              | $19.04 \pm 2.83$  | $3.88 \pm 2.55$   | $4.34 \pm 1.73$   | $2.85 \pm 0.95$   | $1.91 \pm 0.55$  | $1.18 \pm 0.35$ |
| RPE-choroid       | $57.91 \pm 9.07$                                                                              | $52.91 \pm 21.70$ | $27.81 \pm 6.18$  | $23.32 \pm 11.14$ | $25.63 \pm 12.21$ | $13.87 \pm 4.15$ | $3.69 \pm 2.16$ |
| Sclera            | $15.47 \pm 6.95$                                                                              | $4.63 \pm 2.95$   | $0.86 \pm 0.12$   | $1.63 \pm 0.91$   | $0.94 \pm 0.96$   | $0.41 \pm 0.25$  | ND              |
| Optic nerve       | $1.48 \pm 1.12$                                                                               | $0.65 \pm 0.23$   | ND                | ND                | ND                | ND               | ND              |
| Fellow eye        |                                                                                               |                   |                   |                   |                   |                  |                 |
| Conjunctiva       | $0.29 \pm 0.23$                                                                               | ND                | ND                | ND                | ND                | ND               | ND              |
| Aqueous           | $0.10 \pm 0.09$                                                                               | ND                | ND                | ND                | ND                | ND               | ND              |
| Cornea            | $0.15 \pm 0.11$                                                                               | ND                | ND                | ND                | ND                | ND               | ND              |
| Iris-ciliary body | $0.28 \pm 0.04$                                                                               | $0.41 \pm 0.26$   | $0.30 \pm 0.08$   | $0.38 \pm 0.20$   | $0.22 \pm 0.11$   | $0.08 \pm 0.02$  | ND              |
| Lens              | $0.06 \pm 0.06$                                                                               | $0.04 \pm 0.04$   | $0.09 \pm 0.10$   | $0.04 \pm 0.07$   | ND                | ND               | ND              |
| Vitreous          | $0.03 \pm 0.03$                                                                               | $0.05 \pm 0.07$   | $0.10 \pm 0.15$   | $0.01 \pm 0.01$   | $0.01 \pm 0.02$   | ND               | ND              |
| Neural retina     | $0.08 \pm 0.06$                                                                               | $0.09 \pm 0.08$   | ND                | ND                | ND                | ND               | ND              |
| RPE-choroid       | $0.65 \pm 0.14$                                                                               | $0.90 \pm 0.59$   | $0.69 \pm 0.25$   | $0.53 \pm 0.08$   | $0.68 \pm 0.13$   | $0.35 \pm 0.12$  | ND              |
| Sclera            | $0.07 \pm 0.05$                                                                               | $0.07 \pm 0.07$   | ND                | ND                | ND                | ND               | ND              |
| Optic nerve       | ND                                                                                            | ND                | ND                | ND                | ND                | ND               | ND              |
| Blood             | $0.08 \pm 0.04$                                                                               | $0.01 \pm 0.01$   | $0.01 \pm 0.01$   | ND                | ND                | ND               | ND              |

RPE, retinal pigment epithelium. ND, not detectable.

れなかったが、有色ウサギでは注入1週後において虹彩毛様体では $5.74 \pm 2.23 \mu\text{g/g}$ 、神経網膜では $1.91 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$ 、網膜色素上皮・脈絡膜では $13.87 \pm 4.15 \mu\text{g/g}$ とLVFX濃度は高値であった。有色ウサギでは4週後においてもLVFX濃度は虹彩毛様体で $1.84 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$ 、神経網膜で $1.18 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$ 、網膜色素上皮・脈絡膜で $3.69 \pm 2.16 \mu\text{g/g}$ と高値を示した。

有色ウサギにおいても、LVFX非注入眼では視神経以外の測

定したすべての組織でLVFXが検出され、他眼への移行がみられた。なかでも虹彩毛様体(図23)および網膜色素上皮・脈絡膜(図25)では他の組織に比しLVFX濃度は高値であった。虹彩毛様体および網膜色素上皮・脈絡膜内LVFX濃度は注入後12時間以降では注入眼および非注入眼のいずれにおいてもほぼ一定の半減期で減少した(図23, 25)。有色ウサギの血液中にも微量のLVFXが検出された。

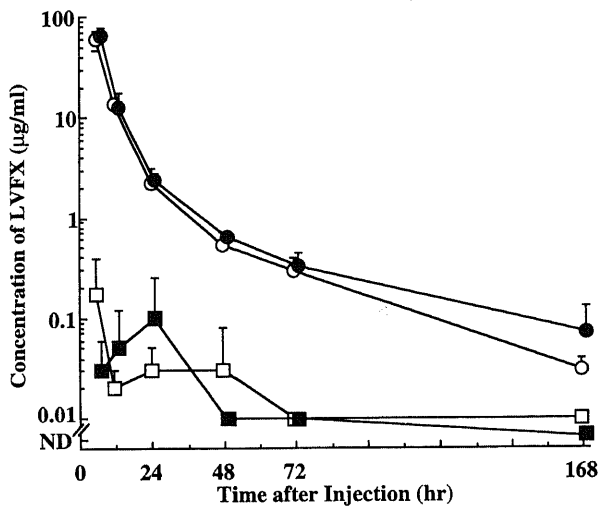


Fig. 22. Concentration of LVFX in the vitreous humor of albino and pigmented rabbits 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hr after an intravitreal injection of  $500 \mu\text{g}$  LVFX. Each data point shows the  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . ○, injected eyes of albino rabbit. ●, injected eyes of pigmented rabbit. □, fellow eyes of albino rabbit. ■, fellow eyes of pigmented rabbit. ND, not detectable (less than  $0.01 \mu\text{g/ml}$ ).

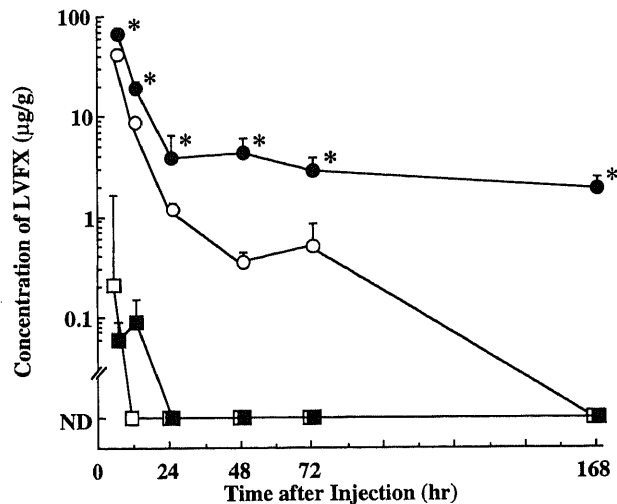


Fig. 24. Concentration of LVFX in the neural retina of albino and pigmented rabbits 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hr after an intravitreal injection of  $500 \mu\text{g}$  LVFX. Each data point shows the  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . ○, injected eyes of albino rabbit. ●, injected eyes of pigmented rabbit. □, fellow eyes of albino rabbit. ■, fellow eyes of pigmented rabbit. ND, not detectable (less than  $0.06 \mu\text{g/g}$ ). \*,  $p < 0.01$  versus albino rabbit group.

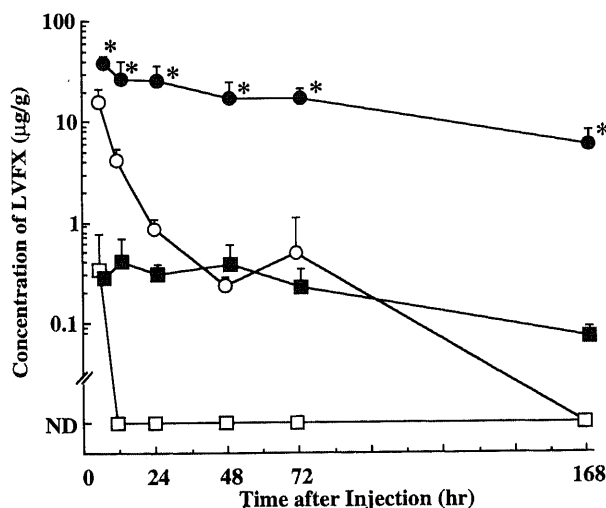


Fig. 23. Concentration of LVFX in the iris-ciliary body of albino and pigmented rabbits 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hr after an intravitreal injection of  $500 \mu\text{g}$  LVFX. Each data point shows the  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . ○, injected eyes of albino rabbit. ●, injected eyes of pigmented rabbit. □, fellow eyes of albino rabbit. ■, fellow eyes of pigmented rabbit. ND, not detectable (less than  $0.08 \mu\text{g/g}$ ). \*,  $p < 0.01$  versus albino rabbit group.

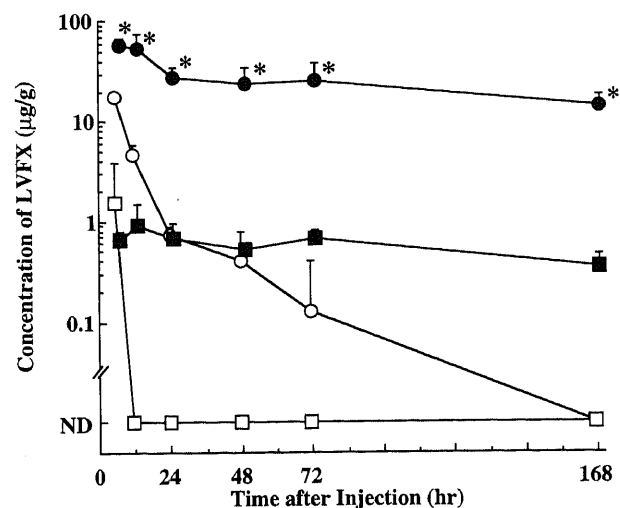


Fig. 25. Concentration of LVFX in the retinal pigment epithelium-choroid of albino and pigmented rabbits 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hr after an intravitreal injection of  $500 \mu\text{g}$  LVFX. Each data point shows the  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . ○, injected eyes of albino rabbit. ●, injected eyes of pigmented rabbit. □, fellow eyes of albino rabbit. ■, fellow eyes of pigmented rabbit. ND, not detectable (less than  $0.10 \mu\text{g/g}$ ). \*,  $p < 0.01$  versus albino rabbit group.

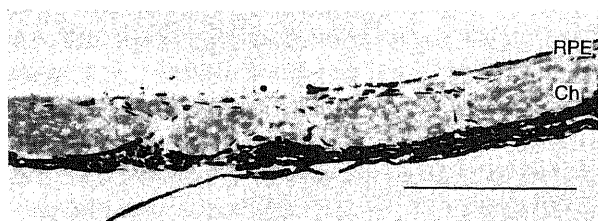


Fig. 26. Light micrograph of the retinal pigment epithelium and the choroid of a pigmented rabbit. The neural retina was peeled off under microscopy without fixation by 3% glutaraldehyde. HE stain. Bar indicates 100  $\mu$ m. RPE, retinal pigment epithelium; Ch, choroid.

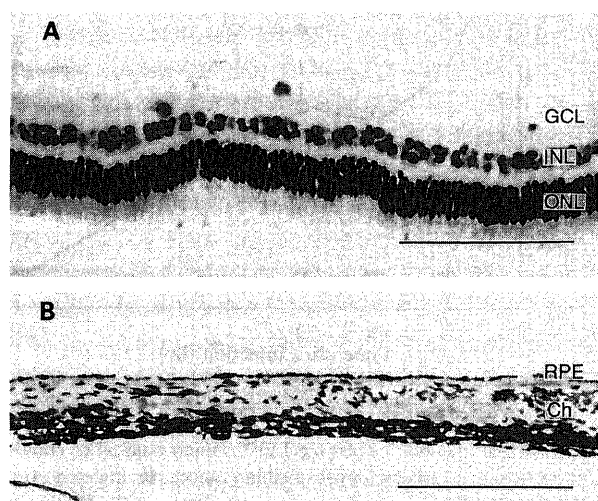


Fig. 27. Light micrographs of the neural retina (A) and the retinal pigment epithelium and the choroid (B) of a pigmented rabbit. The neural retina was peeled off under microscopy after fixation by 3% glutaraldehyde. HE stain. Bar indicates 100  $\mu$ m. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium; Ch, choroid.

#### V. 神経網膜、網膜色素上皮・脈絡膜および強膜の分離方法の検討

##### 1. GA処理法によるLVFX濃度測定

GA処理法で分離した有色ウサギの神経網膜、網膜色素上皮・脈絡膜および強膜内の注入後6時間のLVFX濃度はそれぞれ  $38.48 \pm 10.07 \mu\text{g/g}$ ,  $70.97 \pm 26.61 \mu\text{g/g}$  および  $8.96 \pm 2.76 \mu\text{g/g}$  であった。注入後6時間の網膜色素上皮・脈絡膜および強膜内LVFX濃度には非固定法(成績Ⅳ)とGA処理法との間で有意差はなかった。これに対して注入後6時間の神経網膜内LVFX濃度は非固定法(成績Ⅳ)に比しGA処理法で有意に低かった( $p < 0.01$ )。

GA処理法で分離した有色ウサギの神経網膜、網膜色素上皮・脈絡膜および強膜内の注入後1週間のLVFX濃度はそれぞれ  $0.41 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ ,  $8.62 \pm 2.30 \mu\text{g/g}$  および  $0.35 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$  であった。注入後1週間の強膜内LVFX濃度には非固定法(成績Ⅳ)とGA処理法との間に有意差はなかったが、注入後1週間の神経網膜および網膜色素上皮・脈絡膜内LVFX濃度は非固定法

(成績Ⅳ)に比しGA処理法で有意に低かった(神経網膜では $p < 0.01$ , 網膜色素上皮・脈絡膜では $p < 0.05$ )。

##### 2. 神経網膜、網膜色素上皮・脈絡膜および強膜の分離程度の検討

非固定法で分離した網膜色素上皮・脈絡膜の組織においては、網膜色素上皮が付着している部位と網膜色素上皮が付着していない部位が混在していた(図26)。また非固定法で分離した神経網膜には一部網膜色素上皮が含まれていた。

GA処理法で分離した網膜色素上皮・脈絡膜の組織では、網膜色素上皮はほぼ完全に脈絡膜側に付着して分離されていた。GA処理法を用いて分離した場合には、神経網膜は1枚の膜としてほぼ完全に分離され、神経網膜の組織に網膜色素上皮は全く含まれていなかった(図27)。

##### 3. 湿重量の変化

GA固定後の湿重量は  $110.7 \pm 12.6\%$  であり、湿重量の増加がみられた。

##### 4. LVFXのGA液への漏出

GA液中へのLVFXの漏出率は  $23.6 \pm 10.1\%$  であり、LVFXのGA液中への漏出がみられた。

#### 考 察

眼科領域では数種のフルオロキノロン系抗菌点眼剤が既に市販されており、前眼部感染症に対する第一選択の点眼剤になりつつあるが<sup>28)</sup>、フルオロキノロン剤がメラニン親和性を有し<sup>29)</sup>、長期にわたる内服や点眼によりメラニン含有眼組織内に高濃度に移行蓄積することが動物実験により指摘されている<sup>29-31)</sup>。ヒトにおいて同様の検討を行うことは許されないが、有色人種の虹彩毛様体および網脈絡膜などのぶどう膜にはメラニンが大量に含まれているので、フルオロキノロン剤の全身および局所投与によりフルオロキノロン剤がこれらのメラニン含有眼組織内に大量に移行・蓄積する可能性が高い。過去においてメラニン親和性を有する薬剤の眼毒性としてクロロキン網膜炎<sup>29)・32)</sup>が知られている。クロロキンは1950年代からマラリア、関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、腎炎、ネフローゼ、その他の膠原病の治療に用いられたが、1960年代に入るとクロロキンによる重篤な網膜障害(とくに黄斑部病変)の発生が報告されるに到った<sup>30)・32)</sup>。報告により多少異なるが、クロロキンを1日当たり500mg以上、内服総量が300g以上、またその内服期間が2年間以上の症例にクロロキン網膜炎の発症が多いといわれている<sup>29)</sup>。またいったん発症すれば、メラニン含有眼組織内にクロロキンは長期間にわたって蓄積されるために、内服を中止しても視機能の回復はまれであり、むしろ悪化することもあるという<sup>29)32)</sup>。フルオロキノロン剤は現在比較的安全な薬とされており、薬効には従来の抗生物質を凌ぐものがあることから各科領域で広く用いられているが、フルオロキノロン剤がクロロキンと同様にメラニン含有眼組織に高濃度に移行し、蓄積することにより副作用を引き起こす可能性が危惧され、フルオロキノロン剤の眼に対する安全性の詳細な検討が望まれるようになった<sup>7)</sup>。

ところでLVFXはOFLXの半量でOFLXと同等の臨床効果を示し、薬剤の投与量を減らすことにより副作用が軽減されるのでOFLXよりも安全性の高い薬剤とされ、内科領域ではOFLXに代わってLVFXが用いられるようになってきている<sup>33)</sup>。眼科領域でも、LVFX点眼液が開発途中にありOFLX点眼液に代わり第一選択になりうると考えられる。そこで本研究において

LVFXを選択し、その網膜におよぼす影響およびその眼内動態について種々の検討を行った。

本研究で用いた摘出眼杯ERGの長時間の記録は不可能であるので、長期にわたるLVFXの影響を検討できない。また摘出眼杯ERGでは血流や眼圧が存在しないことや灌流液の温度やpHが生理的な条件下とは異なるなどの欠点があるが、意図した濃度の薬剤を確実に網膜に接触させることができるので、薬剤の網膜への影響が直接評価できる。本研究においてLVFX 500 $\mu$ M灌流およびDR-3354 300 $\mu$ M灌流でOP振幅の選択的低下がみられた(図5, 7, 9, 10)。さらにLVFX 1000 $\mu$ M灌流およびDR-3354 500 $\mu$ M灌流でb波振幅の低下がみられた(図3, 4, 6, 8)。したがってOP振幅およびb波振幅に影響をおよぼす濃度はいずれもDR-3354に比しLVFXの方が高く、光学異性体間で網膜におよぼす影響に差があることが明らかになった。すなわちLVFXはDR-3354に比較して、抗菌活性が高い<sup>10)</sup>のみならず網膜におよぼす影響が少ないことが示された。

フルオロキノロン剤は細菌の細胞質内に存在するDNAジャイレースのサブユニットAを標的として、その活性を阻害することでDNA複製・転写に重大な支障を惹起して殺菌力を発揮するという<sup>30)</sup>。2本鎖DNAを切断・再結合することによりDNAの形状を変換する酵素は、細菌のDNAジャイレースを含め酵素学的にはトポイソメラーゼⅡに分類される。トポイソメラーゼⅡは、真核細胞である酵母<sup>35)</sup>、ショウジョウバエの胚<sup>36)</sup>、カエル卵細胞<sup>37)</sup>、ラット肝臓<sup>38)</sup>およびウシ胸腺細胞<sup>39)</sup>などで分離され、その性状が解析されはじめた。トポイソメラーゼⅡとDNAジャイレースとの類似性が解明されるにしたがって、フルオロキノロン剤のトポイソメラーゼⅡ阻害作用および細胞におよぼす影響が危惧されるようになった<sup>40)</sup>。そのためトポイソメラーゼⅡおよびDNAジャイレースそれぞれのスーパーコイル活性に対するフルオロキノロン剤の50%阻害濃度(50% inhibitory dose, ID<sub>50</sub>)を求め、その比、ID<sub>50</sub>比(トポイソメラーゼⅡに対するID<sub>50</sub>/DNAジャイレースに対するID<sub>50</sub>)をとることでフルオロキノロン剤の選択毒性が比較検討されている<sup>14)11)42)</sup>。DNAジャイレースおよび哺乳動物のトポイソメラーゼⅡに対する阻害活性の解離が大きく、すなわち上記の比が大きい薬剤ほど選択毒性に優れていると考えられる。OFLX, LVFXおよびDR-3354のID<sub>50</sub>比はそれぞれ2461, 3632, 543であり<sup>14)11)42)</sup>、したがってLVFXはOFLXよりも優れた選択毒性を有するが、DR-3354では選択毒性は明らかに劣るといえる。DR-3354に比してLVFXでは網膜におよぼす影響が少ないという本研究における摘出眼杯ERGの結果は選択毒性の結果と対応するようである。

LVFXおよびDR-3354の抗菌活性の違いは、DNA塩基に対する薬剤分子の配向により、DR-3354では初めの分子がDNAに結合できても、2番目以降の分子が結合できずDNAジャイレースの反応の阻害にまで到らないためとされている<sup>43)</sup>。すなわちフルオロキノロン剤がDNAジャイレースの活性を阻害するには、キノロン分子がDNAに結合するだけでは不十分であり、薬剤の分子間形成が必要であるとされている<sup>43)</sup>。本研究の結果より、立体配位の違いが抗菌活性や選択毒性のみならず、網膜毒性への作用においても違いが生じている可能性が考えられた。

LVFXは抗菌活性が高く、選択毒性に優れる上に、摘出眼杯ERGにおける検討で網膜毒性が低い薬剤と考えられることから、眼感染症に対して有用である可能性が高い。しかし眼内に

は眼血液関門とよばれるバリアー機構が存在し<sup>44)</sup>、一般に薬剤の眼内移行は不良であるとされている<sup>45)~49)</sup>ので、眼感染症治療に用いるためには眼内移行の検討が必要である。また他科領域での治療に際して用いられたLVFXの眼毒性を推測するためにも、眼内移行の検討は重要と思われる。

オートラジオグラムによる検討において、眼球全体の放射能は白色ウサギでは経口投与1時間後に最も高く、2時間後、6時間後と時間の経過とともに放射能が徐々に低下した(図11)のに対して、有色ウサギでは1, 2および6時間後のすべての時間において類似した強度および分布を示しており(図12)、白色ウサギに比して有色ウサギではLVFXが眼組織に高濃度かつ長時間分布することが判明した。また、有色ウサギではメラニン含有眼組織における放射能は極めて高かったが、メラニン非含有眼組織における放射能は白色ウサギとほぼ同程度であった(図11, 12)。さらに、経口投与2時間後における眼組織内LVFX濃度を測定したところ、角膜、視神経でのLVFX濃度は有色ウサギに比し白色ウサギで有意に高く、他のメラニン非含有眼組織でのLVFX濃度は白色ウサギと有色ウサギではほぼ同程度であったのに対し、虹彩毛様体や網膜色素上皮・脈絡膜などのメラニン含有眼組織でのLVFX濃度は白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高かった(表1)。これら有色ウサギと白色ウサギにおけるLVFXの眼内分布および各組織内濃度の比較から、LVFXも他のフルオロキノロン剤と同様にメラニン親和性を有し、メラニン親和性が経口投与後の眼内移行に強く影響をおよぼすことが判明した。有色ウサギでは1回の内服により、LVFXはメラニン含有眼組織内に高濃度に移行する(図12, 表1)ことが明らかになったので、長期あるいは大量の内服を行った場合には、LVFXはメラニン含有眼組織内に極めて高濃度に移行し蓄積することが予想される。したがって、長期にLVFX内服投与を行う際には眼毒性に対する十分な注意が必要である。

ところで、眼感染症の中でも最も重篤な疾患のひとつである細菌性眼内炎の治療においては、硝子体内の薬物濃度が最も重要である。本研究において、LVFX 20mg/kg単回経口投与2時間後の硝子体内LVFX濃度は、白色ウサギでは $0.43 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ 、有色ウサギでは $0.41 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ であった。細菌性眼内炎の起原因菌としては外因性(外傷および手術後)では*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*を中心としたコアグラゼ陰性ぶどう球菌および*Pseudomonas aeruginosa*などが、内因性では*Klebsiella pneumoniae*などが重要視されている<sup>15)</sup>。Tanakaら<sup>49)</sup>によれば*Staphylococcus aureus*(メチシリン感受性), *Staphylococcus aureus*(メチシリン耐性), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*および*Klebsiella pneumoniae*に対するLVFXの90%最小発育阻止濃度(90% minimum inhibitory concentration, MIC<sub>90</sub>)はそれぞれ0.78, 0.39, 0.78, 1.56および $0.10 \mu\text{g/ml}$ であるという。したがって、LVFX 20mg/kg単回経口投与後の硝子体内のLVFX濃度は正常眼では*Staphylococcus aureus*(メチシリン耐性)および*Klebsiella pneumoniae*に対してはMIC<sub>90</sub><sup>49)</sup>を凌駕するが、*Staphylococcus aureus*(メチシリン感受性)および*Pseudomonas aeruginosa*に対するMIC<sub>90</sub><sup>49)</sup>を越えることはできず、細菌性眼内炎の治療にはLVFX 20mg/kg単回経口投与では十分といえない。炎症眼では眼血液関門が破壊されていることが多いので、LVFXの全身投与では、正常眼に比べ眼内移行が促進されて炎症眼においてはLVFX硝子体内濃度が高まる可能性もある<sup>50)</sup>が、一方眼外への

排出が増大して逆に硝子体内濃度が低下しやすいとも考えられる<sup>51)</sup>。これに対処するにはLVFXを硝子体内に直接注入する方法が有用と考えられる。しかし抗菌剤の硝子体内投与に起因したと思われる網膜毒性が報告されている<sup>52)~56)</sup>ので、抗菌剤の硝子体内注入療法を行うにあたっては、抗菌剤の網膜毒性を来たさない硝子体内許容注入量の決定が必要である。そこで本研究ではLVFX硝子体内許容注入量の決定を目的として、LVFXの網膜におよぼす影響を検討し、網膜に対する安全性を評価した。

本研究により、LVFX 200および500 $\mu$ g硝子体内注入は電気生理学的ならびに組織学的に、白色および有色ウサギの網膜に影響をおよぼさないことが明らかになった。これまでに数種のフルオロキノロン剤の硝子体内注入の網膜におよぼす影響が検討されている<sup>57)~62)</sup>。たとえばウサギ眼での硝子体内注入法による検討において、ノルフロキサシン (norfloxacin, NFLX) (点眼剤) 300 $\mu$ g, NFLX (研究用原末) 50または500 $\mu$ gおよびLFLX 500 $\mu$ g注入によりOP振幅の低下ならびにb波振幅の変化が一過性にみられている<sup>57)~59)</sup>。またOFLX (研究用原末) 200 $\mu$ g注入またはOFLX (点眼剤) 300 $\mu$ gの注入では、ERGの各波に異常はみられなかったという<sup>57)~60)</sup>。さらにMarcheseら<sup>61)</sup>は有色ウサギでシプロフロキサシン (ciprofloxacin, CPMX) の毒性を検討し、CPMX 1000 $\mu$ g硝子体内注入でb波振幅の低下が生じ、500および1000 $\mu$ g注入では光顕による観察で異常がみられたと報告している。Stevensら<sup>62)</sup>も有色ウサギでCPMXの毒性を検討し、250 $\mu$ g以上の注入ではb波振幅の低下および組織学的異常 (電顕) がみられ、1000 $\mu$ g注入では光顕においても異常がみられたという。Marcheseら<sup>61)</sup>やStevensら<sup>62)</sup>はOPについて検討していないが、本研究およびこれまでの報告<sup>57)~59)~61)~62)</sup>からみるとフルオロキノロン剤が網膜におよぼす影響のなかではOP振幅の低下が最も特徴的な変化であり、かつ最も鋭敏な指標となり得ると考えられる。

本研究において、1000および2000 $\mu$ g硝子体内注入では注入3時間後にOP振幅の有意な低下とO<sub>2</sub>潜時の延長傾向がみられた (図17, 18)。これらの変化を示したウサギから注入後4週目に摘出した眼球の光顕および電顕による組織学的検討では、白色および有色ウサギともに対照眼と比較してLVFX注入眼に明らかな変化はなかった (図20, 21)。また、LVFX 1000および2000 $\mu$ g硝子体内注入3時間後にERG変化がみられたので、LVFX 2000 $\mu$ g硝子体内注入3時間後の時点での組織学的検討も行ったが、白色および有色ウサギともに光顕および電顕では対照眼と比較してLVFX注入眼に明らかな変化はなかった。したがって、ERGには異常がみられても網膜には形態学的異常は認められないことが明らかになった。OPの発生には双極細胞およびアマクリン細胞などの網膜内層の神経細胞の関与が示唆されている<sup>63)~67)</sup>ので、ERG変化とあわせて考えると、過量のLVFX硝子体内注入は網膜内層に可逆的な機能低下を生じさせる可能性があるとして推論される。

フルオロキノロン剤がメラニン含有眼組織内に高濃度に移行する<sup>1)~4)~54)~56)</sup>ことからメラニン含有眼組織、特に網膜色素上皮への影響が危惧されている。Mochizukiら<sup>58)</sup>によれば、NFLX 500 $\mu$ g硝子体内注入によってc波振幅は白色ウサギでは変化しなかったが、有色ウサギでは5匹中2匹で注入3時間後に減弱し、そのうち1匹では注入7日後でも振幅比は対照眼の53%であったという。本研究においても網膜色素上皮の機能を反映するとさ

れるc波<sup>68)</sup>および組織学的検討を行ったが、いずれの硝子体内注入量においても網膜色素上皮に異常はなかった。

本研究によりウサギ網膜に影響をおよぼさないことが明らかとなった500 $\mu$ gのLVFXがウサギ硝子体内 (容積約1.7ml) に均等に拡散すると仮定すると、その硝子体内濃度は約290 $\mu$ g/mlとなる。この濃度は前述の細菌性眼内炎の主要な起因菌のMIC<sub>90</sub><sup>49)</sup>をはるかに凌駕する濃度である。また渡辺ら<sup>69)</sup>によれば、*P. acnes*に対するLVFX, OFLX, NFLXおよびトスフロキサシンのMICは、それぞれ0.39, 0.78, 6.25および1.56 $\mu$ g/mlであり、LVFXは他のフルオロキノロン剤と比較して*P. acnes*に強い抗菌力を示すという。したがって、眼内レンズ移植術後の晚期合併症として近年注目されている*P. acnes*眼内炎<sup>69)</sup>の治療にもLVFX硝子体内注入が有用であろう。

硝子体内に注入された薬物は徐々に眼外へ排出されるので、LVFX硝子体内注入を臨床応用する際には注入後の硝子体内濃度の推移が重要である。また、硝子体内注入されたLVFXが他の眼組織にどのように移行し、消退していくかを知ることにより、経口投与後の眼内移行実験の結果とあわせて眼血液関門およびメラニンを経したLVFXの動態がより詳細に検討できるであろう。そこで本研究によりウサギ網膜に影響をおよぼさないことが明らかとなったLVFX 500 $\mu$ gを硝子体内に注入し、注入後の眼各組織内のLVFX濃度を測定した。

白色および有色ウサギのLVFX 500 $\mu$ g硝子体内注入後の硝子体内濃度は24時間後においてもそれぞれ $2.22 \pm 0.92 \mu\text{g/ml}$ および $2.42 \pm 0.34 \mu\text{g/ml}$ であり、少なくとも細菌性眼内炎の主要な起因菌<sup>15)</sup>のMIC<sub>90</sub><sup>49)</sup>を24時間は凌駕することが明らかになった (図22)。硝子体からの物質の消失経路は、後方すなわち網膜 (血管) および網膜色素上皮を介する経路 (後方消失路) と、前方すなわち後房・前房を経て房水の排出路を介する経路 (前方消失路) の二つに大別される<sup>70)</sup>。後方からの消失には能動的な物質輸送機構が関与していることが多く硝子体からの消失が速やかであり、それに対して前方消失路では硝子体からの消失が比較的緩やかであるとされている<sup>70)</sup>。ペニシリン<sup>71)</sup>、メチシリン<sup>72)</sup>、カルペニシリン<sup>73)</sup>およびセファゾリン<sup>73)</sup>などは半減期が短く後方消失路を介しており、硫酸ゲンタマイシン (gentamicin sulfate, GM)<sup>51)~73)</sup>やトブラマイシン<sup>74)</sup>などのアミノ配糖体は半減期が長く前方消失路を介していることが知られている。LVFXの注入後24時間までの硝子体内半減期は白色および有色ウサギともに4~5時間であり、LVFXの硝子体からの消失速度は比較的速やかであり (図22)、硝子体内注入後の前房水のLVFX濃度も低く、LVFXは後方消失路を介していると考えられる。虹彩毛様体 (図23) や網膜色素上皮・脈絡膜 (図25) などのメラニン含有眼組織内のLVFX濃度は、測定したいずれの時点においても白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高かった。注入1週後の虹彩毛様体および網膜色素上皮・脈絡膜の白色ウサギのLVFX濃度に対する有色ウサギの比はそれぞれ約70および約80であった。また有色ウサギのメラニン含有眼組織では、4週後においても高濃度のLVFXが残留していた (表3)。このことからLVFXは硝子体内注入後においてもメラニン含有眼組織に高濃度に移行し滞留することが明らかとなった。井上ら<sup>75)</sup>は白内障患者にLFLX 200mgを1日2回、3日間内服させた後の前房水内および血清中濃度を測定し、投与終了後24時間以降には前房水内濃度が血清中濃度を凌駕すると報告した。その理由として彼ら<sup>75)</sup>はLFLXが虹彩毛様体のメラニンに捕捉集

積され、血清中濃度が低下すると毛様体から LFLX が逆放出されると推測した。本研究においても内服後の眼内移行とあわせて考えると、眼内外に投与された LVFX はメラニン親和性によりメラニン含有組織に捕捉され、その後徐々に放出されると考えられる。

LVFX のメラニン親和性はその眼内動態に重大な影響をおよぼすことが判明した。しかし LVFX 硝子体内注入の網膜におよぼす影響の検討では、ERG・VEP の検討および組織学的検討ともに白色ウサギと有色ウサギの間には LVFX の網膜毒性の差はなかった。鳥崎<sup>59)</sup>は、同じフルオロキノロン剤である LFLX の網膜におよぼす影響には白色ウサギと有色ウサギの間では差はなかったとしており、本研究の結果と同様であった。一方、Zemel<sup>70)</sup>は、白色ウサギおよび有色ウサギにおける GM の網膜毒性を ERG の b 波および光顕を用いて比較検討した。彼ら<sup>70)</sup>によれば b 波振幅は有色ウサギに比し白色ウサギで有意に低下し、GM の硝子体内注入量の安全量は白色ウサギに比較し有色ウサギで高かったという。その理由として、GM がメラニンと結合し不活化されるので有色ウサギでは毒性が少なかった可能性を推測している。

Fukuda<sup>71)</sup>は、OFLX や LFLX などのフルオロキノロン剤はメラニンと結合するが抗菌活性の低下がみられなかったとしている。それに対して、硫酸シソマイシン、GM やトブラマイシンなどのアミノ配糖体ではメラニン結合率が極めて高くかつメラニンと結合した状態では抗菌活性が著しく低下したという<sup>72)</sup>。したがって同じくメラニン親和性を有する薬剤であっても、フルオロキノロン剤とアミノ配糖体ではその結合様式や部位が異なっており、そのためにメラニンと結合した薬剤の抗菌活性や毒性の変化に差が生じ、本研究や鳥崎<sup>59)</sup>の結果と Zemel<sup>70)</sup>の結果に差が生じた可能性が考えられる。

LVFX 500  $\mu$ g 硝子体内注入により有色ウサギの網膜色素上皮・脈絡膜内に高濃度の LVFX が移行し滞留していたことから、2000  $\mu$ g 注入ではさらに高濃度の LVFX が網膜色素上皮・脈絡膜内に移行することが予想される。しかし LVFX 2000  $\mu$ g 注入においても c 波および網膜色素上皮に異常はみられなかった。一方、Mochizuki<sup>58)</sup>は NFLX 500  $\mu$ g を反復して硝子体内に注入した場合に白色および有色ウサギのいずれにおいても光顕および電顕的に網膜色素上皮細胞の肥大および局所的な網膜構造の破壊を特徴とする網膜病変がみられたと報告した。したがって、本研究においてはいずれの濃度の LVFX 単回注入でも網膜色素上皮に異常はみられなかったが、LVFX の反復注入では網膜色素上皮を含めたメラニン含有眼組織の障害がおこる可能性もありうる。臨床的に LVFX 硝子体内注入を行う場合にはできる限り反復注入は避けるべきと考える。

白色ウサギおよび有色ウサギのいずれにおいても、片眼に注入された LVFX が、非注入眼においても視神経以外の測定したすべての組織で検出された。特に有色ウサギにおいてはメラニン含有眼組織では血中濃度を上回る LVFX が移行していた。また注入後 12 時間以降のメラニン含有眼組織内の LVFX 濃度の推移は注入眼と非注入眼ではほぼ同様であった。この結果は、片眼に注入された LVFX が血液を介して他眼に移行すること、たとえば血液中の LVFX 濃度が低くてもメラニン含有眼組織内に吸着されてその組織内 LVFX 濃度が高まることおよびその後ほぼ一定の速度でメラニンから LVFX が放出されることを示している。伊吹<sup>9)</sup>は、イヌに LVFX を 20mg/kg/日 で 2 週間内服させ

た後の眼組織内 LVFX 濃度を検討した。彼ら<sup>9)</sup>によれば、イヌでは投与終了 3 時間後に虹彩毛様体および網膜色素上皮・脈絡膜ともに 1000  $\mu$ g/g 以上の LVFX が蓄積しており、24 時間経ってもほとんど減衰しなかったが、1 週間後には 200～400  $\mu$ g/g に減衰したという。一方、メラニンを含有しない神経網膜内 LVFX 濃度は網膜色素上皮・脈絡膜内 LVFX 濃度の 1% 以下と低値であった<sup>9)</sup>。この結果は、LVFX がメラニン含有眼組織内に蓄積することを明示している。本研究と考えあわせると、たとえ少量であっても LVFX の長期投与の際には眼毒性の発現には十分に注意すべきである。

LVFX の眼内移行および硝子体内注入後の眼内動態を検討する際には、LVFX がメラニン親和性を有するのでメラニン含有組織内における LVFX 濃度の測定方法が問題となる。高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) によるメラニン含有組織内のフルオロキノロン剤濃度の測定に際しては、従来用いられてきた中性抽出法ではフルオロキノロン剤の抽出は不十分であるとされている<sup>73)</sup>。そこで強アルカリを用いた種々の抽出法が検討されており<sup>39,74)</sup>、小室<sup>75)</sup>は <sup>14</sup>C-NFLX を全身投与したウサギにおいてメラニン含有組織からの NFLX 抽出に際し、強アルカリを加えてホモジナイズし、一晚室温に放置した後に遠心分離する方法を検討した。この方法<sup>76)</sup>を用いれば 95% 以上の放射能が回収され、またその定量法を用いて <sup>14</sup>C-NFLX を投与した有色ウサギの眼組織内薬物濃度を HPLC により測定したところ、燃焼法で測定した薬物濃度とほぼ一致したと報告した<sup>76)</sup>。しかし、LVFX に関しては HPLC による濃度測定に際してのメラニン含有組織からの抽出率は検討されていないので、LVFX の抽出率に影響されず最も信頼できる値を得るために、本研究では <sup>14</sup>C-LVFX を用いて LVFX 濃度を測定した。LVFX のヒト代謝産物としては、血清中に脱メチル LVFX および酸化 LVFX がそれぞれ LVFX の 1.2% および 0.6% 程度検出されるのみとされている<sup>77)</sup>。種差のある可能性も否定できないがウサギにおいても代謝は僅少であると推定し、本研究では検出される放射能はすべて <sup>14</sup>C-LVFX からのものであると考えて LVFX 濃度を計算した。

有色ウサギの網膜はメラニンを含まない神経網膜とメラニンを含んだ 1 層の網膜色素上皮からなるので、メラニン親和性のある薬剤の眼内動態を検討する際には神経網膜と網膜色素上皮を分離して測定することが望ましいと考えられる。しかしフルオロキノロン剤濃度を正確に測定することのできる神経網膜分離方法はいまだ確立されていない。過去において凍結下の分離法<sup>59)</sup>および GA 処理法<sup>9)</sup>が提案されているが、凍結下の分離法では組織の湿重量の変化があり、GA 処理法は固定液への薬剤の漏出および湿重量の変化が濃度の測定値におよぼす影響が大きいと思われる。これらの問題点に関してはこれまで検討されていないので、本研究では GA 処理法と非固定法を比較検討した。GA 処理法では完全に神経網膜と網膜色素上皮を分離することができた (図 27) が、約 10% の湿重量の増加および約 20% の固定液への LVFX の漏出がみられた。各組織ごとの湿重量の変化および固定液への LVFX の漏出を正確に求めることは不可能であり、正確な LVFX 濃度を計算することは困難である。一方、非固定法では湿重量の変化や固定液への LVFX の漏出は起こらないが、神経網膜と網膜色素上皮を完全に分離することは難しく (図 26)、神経網膜内 LVFX 濃度は付着した網膜色素上皮の影響を受けうると考えられる。したがって、眼組織内のフルオロ

キノロン剤濃度の評価にあたっては組織分離方法による違いを十分考慮する必要があるとともに、今後さらに正確な分離方法の開発が重要と思われる。

本研究においてLVFX 500  $\mu$ g硝子体内注入はウサギ網膜に影響をおよぼさず、かつ注入後少なくとも24時間にわたり細菌性眼内炎の主要な起因菌のMIC<sub>90</sub><sup>(4)</sup>を凌駕することが明らかになり、臨床応用が十分期待できる。ウサギおよびヒトの硝子体容積はそれぞれ約1.7mlおよび約4mlであり、ウサギと同量のLVFXを注入した際にはヒト硝子体内のLVFX濃度は半分以下となる。黄斑を有するサルおよびヒトと、黄斑を有しないウサギとでは眼毒性が異なる可能性が指摘されており<sup>(8)</sup>、ヒトに用いる際には安全域を十分にとる必要があるため臨床応用する際にはLVFX硝子体内注入量としては500  $\mu$ gを凌駕すべきではないと考えられる。LVFX 500  $\mu$ gがヒト硝子体内に均等に拡散した場合には硝子体内のLVFX濃度は約125  $\mu$ g/mlとなり、細菌性眼内炎の主要な起因菌のMIC<sub>90</sub><sup>(4)</sup>を十分に凌駕する。したがってLVFX 500  $\mu$ g硝子体内注入は細菌性眼内炎の治療において安全かつ有用な手段であろう。

## 結 論

レボフロキサシン (LVFX) およびその光学異性体DR-3354の網膜におよぼす影響を白色ウサギの摘出眼杯ERGのa波、b波およびOPを指標として比較検討し、さらにLVFXの硝子体内注入が網膜におよぼす影響を白色および有色ウサギにおいてERGのa波、b波、c波、OPおよびVEPならびに組織学的検査法を指標として検討し、下記の結果を得た。またLVFXの経口投与後の眼内移行およびLVFXの硝子体内注入後の眼内動態を白色ウサギおよび有色ウサギを用いて比較検討し、下記の結果を得た。

1. 摘出眼杯ERGによる検討では、LVFX 300  $\mu$ MおよびDR-3354 100  $\mu$ M灌流ではERG各波に変化はなかったが、LVFX 500  $\mu$ MおよびDR-3354 300  $\mu$ M灌流ではOP振幅は低下した。摘出眼杯ERGに変化をきたさない薬物濃度はDR-3354に比してLVFXが高く、光学異性体間で網膜におよぼす影響に差異がみられた。

2. LVFX 200  $\mu$ gまたは500  $\mu$ gの硝子体内注入では白色ウサギおよび有色ウサギともにERG各波に変化はなかったが、LVFX 1000  $\mu$ gまたは2000  $\mu$ gの硝子体内注入では白色ウサギおよび有色ウサギともにOPの振幅が一過性に低下した。いずれの注入量においてもERGのc波およびVEPの早期成分に変化はなく、組織学的にも網膜に明らかな変化はなかった。

3. LVFX 20mg/kg経口投与後の眼内移行は、白色ウサギでは投与1時間後に最も高く、その後は時間経過とともに減少したのに対し、有色ウサギでは投与1～6時間後ではほぼ同程度であった。

4. LVFX 20mg/kg経口投与2時間後において、LVFX濃度は硝子体、前房水および水晶体などのメラニン非含有組織では白色ウサギと有色ウサギとの間で有意には相違しなかったが、虹彩毛様体および網脈絡膜などのメラニン含有眼組織では白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高かった。

5. LVFX 500  $\mu$ g硝子体内注入後の硝子体内LVFX濃度は白色および有色ウサギともに同様の推移を示し、細菌性眼内炎の主要な起因菌のMIC<sub>90</sub>を注入後少なくとも24時間凌駕した。虹彩毛様体および網膜色素上皮・脈絡膜などのメラニン含有眼組

織内LVFX濃度は測定したいずれの時点においても白色ウサギに比し有色ウサギで有意に高かった。LVFX硝子体内注入後にLVFXは有色ウサギのメラニン含有眼組織内に高濃度に移行し残留した。

6. 電気生理学および組織学的にLVFX 200  $\mu$ gおよび500  $\mu$ g硝子体内注入はウサギ網膜に明らかな影響を与えない。しかしLVFXがメラニン含有眼組織内に長時間にわたり残留するので、LVFXの頻回の局所投与および長期間の全身投与の際には眼毒性の発現に十分に注意すべきである。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導・御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深甚の謝意を捧げます。また貴重な御指導・御協力を賜りました金沢大学アイソトープ総合センター森 厚文教授、柴 和弘博士に深く感謝致します。また御指導いただきました鳥崎真人博士、山下陽子博士、小松雅樹学士、棚橋俊郎学士、東出朋巳博士をはじめ、本研究に御協力下さいました緒方正史学士、武村麻子学士、酒井宏之学士に深く感謝致します。また貴重な御助言を賜りました望月清文博士に深く感謝致します。実験器具・装置の作製について御協力下さいました元本学工作係水野清澄技官に感謝致します。

## 文 献

- 1) 福田正道, 佐々木一之. 化学療法剤の眼内移行動態におけるメラニンの関与. 日眼会誌 92: 1839-1843, 1988
- 2) 三井幸彦, 三田四郎. オフロキサシン点眼液の有色動物における眼内動態 —とくに眼の安全性について—. あたらしい眼科 10: 83-86, 1993
- 3) 福田正道, 佐々木一之. フルオロキノロン系抗菌剤ノルフロキサシンの有色家兎眼への移行動態. あたらしい眼科 10: 431-434, 1993
- 4) 伊吹 肇, 池井辰夫, 谷岡秀敏, 高階秀男. レボフロキサシンの有色動物における眼内動態. あたらしい眼科 10: 2071-2074, 1993
- 5) 三井幸彦, 大久保秀夫, 小室正勝. Norfloxacinの有色動物における眼内動態. Chemotherapy 42: 413-419, 1994
- 6) 寺井 正, 池尻芳文, 松本隆弘, 渡辺則子, 吹上知穂, 小河貴裕. 有色動物におけるLomefloxacinの眼内動態. あたらしい眼科 10: 2067-2070, 1993
- 7) 三井幸彦. フルオロキノロン剤の問題点. あたらしい眼科 9: 215-223, 1992
- 8) Meisler DM, Mandelbaum S. *Propionibacterium*-associated endophthalmitis after extracapsular cataract extraction. Review of reported cases. Ophthalmology 96: 54-61, 1989
- 9) 岩瀬 剛, 柳田 隆, 山下陽子, 寺井裕子, 藤井 茂, 望月清文, 齋藤友護, 大西克尚. 眼内レンズ挿入術後に発症した*Propionibacterium acnes*による遅発性眼内炎の1例. 臨眼 50: 1669-1674, 1996
- 10) Driebe WT Jr, Mandelbaum S, Forster RK, Schwartz LK. Pseudophakic endophthalmitis: Diagnosis and management. Ophthalmology 93: 442-448, 1986
- 11) 井上幸次. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, メチシリン耐性表皮ブドウ球菌. 眼微生物辞典 (大橋裕一, 望月 學編), 第1版, 140-147頁, メジカルビュー社, 東京, 1996
- 12) 阿部達也, 大石正夫. MRSAとMRSE —Ocular infections by MRSA and MRSE—. 眼科 36: 351-358, 1994

- 13) 宮永嘉隆. 眼内レンズ移植術での感染症. 眼内手術 術後感染症の予防と治療 (真鍋禮三編), 第1版, 61-69頁, ファーマインターナショナル, 東京, 1992
- 14) 半田 光. DR-3355. キノロン薬 (上田 泰, 清水喜八郎, 紺野昌俊, 松本文夫編), 第1版, 424-425頁, ライフ・サイエンス, 東京, 1991
- 15) 秦野 寛, 井上克洋, 的場博子, 栗田正幸, 池田祥子, 田川義継, 亀井俊也, 坂本真栄, 石橋康久, 渡辺亮子, 中野直樹, 吉沢 徹, 玉置泰裕, 澤 充, 矢野啓子, 上杉るり子, 大戸純恵, 臼井正彦, 関 文治, 高村悦子, 中川ひとみ, 三国郁夫, 田沢 博, 坂上富士男, 大石正夫, 桐生純一, 石郷岡均, 横井則彦, 天津 寿, 原 吉幸, 杉本麗子, 塩田 洋, 兼松和代, 阿部真知子, 高岡明彦, 坂田広志, 梶原 良, 鎌田龍二, 宮川真一, 大野重昭, 内田幸男, 北野周作. 日本の眼内炎の現状-発症動機と起因菌-. 日眼会誌 95: 369-376, 1991
- 16) 五島瑳智子, 宮崎修一, 石田佳久. ニューキノロン系抗菌剤 levofloxacin (DR-3355) の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用. Chemotherapy 40 (s-3): 14-26, 1992
- 17) 川口博治, 米村大蔵, 河崎一夫, 柴田二郎, 臼倉弘子, 田辺譲二, 中川寛忠. 家兎眼 *in vitro* ERG におよぼす浸漬液 pH の影響. 日眼会誌 83: 454-462, 1979
- 18) 長山理三郎. 摘出家兎網膜 ERG の実験的研究. 第 I 報 摘出家兎網膜からの ERG の誘導. 日眼会誌 73: 1900-1908, 1969
- 19) 米村大蔵, 河崎一夫. 律動様小波とその臨床. 眼科 MOOK No.14. 眼と電気生理 (田沢 豊編), 第1版, 59-70頁, 金原出版, 東京, 1980
- 20) 西 興史. 動物実験における確実な麻酔法. 日本の眼科 60: 877-878, 1989
- 21) 米村大蔵, 土田 豊, 藤村和昌, 山田芳明. 家兎視神経及び視覚領における新誘発電位成分について. 日眼会誌 71: 230-234, 1967
- 22) 米村大蔵, 土田 豊, 山田芳明, 藤村和昌. 家兎 VEP における初期陽性電位について. 日眼会誌 71: 449-453, 1967
- 23) Hughes A, Wilson ME. Callosal terminations along the boundary between visual areas I and II in the rabbit. Brain Res 12: 19-25, 1969
- 24) 井上治郎, Potts AM. 家兎の EER (electrically evoked response of the visual system) について. 日眼会誌 75: 765-772, 1971
- 25) Spivey BE, Pearlman JT. Day-to-day variations in the ERG of humans and rabbits. Am J Ophthalmol 55: 1013-1020, 1963
- 26) Lawwill T. Practical rabbit electroretinography. Am J Ophthalmol 74: 135-141, 1972
- 27) 稲富 誠, 杉町剛美, 中島 章. 麻酔薬のラット ERG におよぼす影響. 眼紀 29: 737-742, 1978
- 28) 宮永嘉隆. 種々の結膜炎. 臨眼 46: 11号増刊号, 85-89, 1992
- 29) 中尾雄三. 薬物中毒と黄斑部病変. 眼科診療プラクティス No.13. 黄斑部疾患の診療指針 (丸尾敏夫, 本田孔士, 臼井正彦, 田野保雄編), 第1版, 120-123頁, 文光堂, 東京, 1994
- 30) Hobbs HE, Eadie SP, Somerville F. Ocular lesions after treatment of chloroquine. Br J Ophthalmol 45: 284-297, 1961
- 31) Bernstein HN. Chloroquine ocular toxicity. Surv Ophthalmol 12: 415-447, 1967
- 32) 窪田靖夫. クロロキン網膜症の臨床像. 眼科 18: 133-138, 1976
- 33) 齊藤 厚, 重野芳輝, 伊良部勇栄, 普久原浩, 齊藤 玲, 富澤磨須美, 中山一朗, 平賀洋明, 大道光秀, 武部和夫, 田村昌士, 小西一樹, 守 義明, 瀧島 任, 丹野恭夫, 本宮雅吉, 大泉耕太郎, 渡辺 彰, 中井祐之, 齊藤純一, 今野 淳, 新藤哲, 長井弘策, 新妻一直, 勝 正孝, 広瀬 寛, 石井昌俊, 嶋田甚五郎, 柴 孝也, 吉田正樹, 酒井 紀, 谷本普一, 小原一夫, 清水喜八郎, 戸塚恭一, 片平潤一, 島田 馨, 後藤 元, 岡 慎一, 緒方芳久, 稲松孝思. 増田義重, 坂元寛志, 巨島文子, 小平 誠, 佐野靖之, 宮本康文, 小林宏行, 池本秀雄, 森健, 稲垣正義, 中田紘一郎, 中森祥隆, 中谷龍王, 河合 健, 本間光夫, 可部順三郎, 工藤宏一郎, 有岡 仁, 小山 優, 穴戸春美, 菊池典雄, 猪狩英俊, 多部田弘士, 小田切繁樹, 鈴木周雄, 高橋 宏, 高橋健一, 芦刈靖彦, 萩原恵里, 天野泰嗣, 庄司 晃, 松本文夫, 今井健郎, 入交昭一郎, 松岡康夫, 小花光夫, 荒川正昭, 和田光一, 塚田弘樹, 川島 崇, 関根 理, 鈴木康稔, 宇野勝次, 青木信樹, 佐藤篤彦, 岩田政敏, 千田金吾, 志知 泉, 岡野博一, 岡野昌彦, 谷口正実, 佐竹辰夫, 高木健三, 山本健市, 宮武博之, 山本俊幸, 鈴木幹三, 足立 暁, 松浦 徹, 久世文幸, 池上達義, 鈴木克洋, 坂東憲司, 千葉秀, 長谷川吉則, 縄田隆平, 稲葉宣雄, 鍵岡 朗, 長谷光雄, 螺良英郎, 中川 勝, 岸本 進, 大澤仲昭, 五十嵐 敢, 小牟田清, 前田恵治, 坂谷光則, 曾根未年生, 高橋安毅, 岡田達也, 小河原光正, 東野一彌, 中野孝司, 三本文雄, 中島重徳, 保川淳, 成田亘啓, 澤木政好, 三笠桂一, 副島林造, 沖本二郎, 角 優, 松島敏春, 田野吉彦, 佐々木孝夫, 松本行雄, 杉本勇二, 山本戸道郎, 長谷川健司, 栗村 統, 澤江義郎, 高木宏治, 下野信行, 篠田 厚, 石橋凡雄, 高木正祇, 山田穂積, 加藤 収, 青木洋介, 黒木茂高, 原 耕平, 古賀宏延, 福島喜代康, 中村久助, 神田哲郎, 石黒美矢子, 木谷崇和, 草野史郎, 松本慶蔵, 真崎宏則, 田中宏史, 那須 勝, 後藤陽一郎, 永井寛之, 山崎透, 田代隆良, 岳中耐夫, 志摩 清, 賀来満夫, 菅原和行, 山口恵三. 内科領域感染症に対する Levofloxacin の臨床評価. Chemotherapy 40 (s-3): 147-169, 1992
- 34) 佐藤謙一, 安江徳太郎, 星野一樹. キノロンの DNA ジャイレース阻害作用. ニューキノロン. あすの抗菌剤をめざして (三橋 進編), 第1版, 121-127頁, 学会出版センター, 東京, 1991
- 35) Goto T, Wang JC. Yeast DNA topoisomerase II. J Biol Chem 257: 5866-5872, 1982
- 36) Hsieh T, Brutlag D. ATP-dependent DNA topoisomerase from *D. melanogaster* reversibly catenates duplex DNA rings. Cell 21: 115-125, 1980
- 37) Benedetti P, Baldi MI, Mattoccia E, Tocchini-Valentini GP. Purification and characterization of *Xenopus laevis* topoisomerase II. EMBO J 2: 1303-1308, 1983
- 38) Duguet M, Lavenot C, Harper F, Mirambeau G, de Recondo AM. DNA topoisomerases from rat liver: physiological variations. Nucleic Acids Res 11: 1059-1075, 1983
- 39) Halligan BD, Edwards KA, Liu LF. Purification and characterization of a type II DNA topoisomerase from bovine calf thymus. J Biol Chem 260: 2475-2482, 1985

- 40) Hussy P, Maass G, Tümmeler B, Grosse F, Schomburg U. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase  $\alpha$  primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob Agents Chemother* 29: 1073-1078, 1986
- 41) Hoshino K, Sato K, Une T, Osada Y. Inhibitory effects of quinolones on DNA gyrase of *Escherichia coli* and topoisomerase II of fetal calf thymus. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1816-1818, 1989
- 42) Hoshino K, Sato K, Akahane K, Yoshida A, Hayakawa I, Sato M, Une T, Osada Y. Significance of the methyl group on the oxazine ring of ofloxacin derivatives in the inhibition of bacterial and mammalian type II topoisomerases. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 309-312, 1991
- 43) 星野一樹, 佐藤謙一. キノロンのDNA結合性について. ニューキノロン. あすの抗菌剤をめざして (三橋 進編), 第1版, 134-139頁, 学会出版センター, 東京, 1991.
- 44) 塩瀬芳彦. 眼内 barrier 機構とその臨床意義. *臨眼* 31: 9-21, 1977
- 45) Rubinstein E, Goldfarb J, Keren G, Blumenthal M, Treister G. The penetration of gentamicin into the vitreous humor in man. *Invest Ophthalmol & Visual Sci* 24: 637-639, 1983
- 46) Peyman GA, May DR, Homer PI, Kasbeer RT. Penetration of gentamicin into the ahakic eye. *Ann Ophthalmol* 9: 871-880, 1977
- 47) 林 英之, 百枝 榮, 京野真三, 清沢崇晃. 筋肉内投与されたゲンタマイシンの硝子体切除眼硝子体腔中への移行に関する実験的研究. *眼紀* 34: 2305-2308, 1983
- 48) Pryor JG, Apt L, Leopold IH. Intraocular penetration of vancomycin. *Arch Ophthalmol* 67: 608-611, 1962
- 49) Tanaka M, Otuki M, Une T, Nishino T. In-vitro and in-vivo activity of DR-3355, an optically active isomer of ofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 26: 659-666, 1990
- 50) Martin DF, Ficker LA, Aguilar HA, Gardner SK, Wilson LA, Meredith TA. Vitreous cefazolin levels after intravenous injection. Effects of inflammation, repeated antibiotic doses, and surgery. *Arch Ophthalmol* 108: 411-414, 1990
- 51) Kane A, Barza M, Baum J. Intravitreal injection of gentamicin in rabbits. Effect of inflammation and pigmentation on half-life and ocular distribution. *Invest Ophthalmol & Visual Sci* 20: 593-597, 1981
- 52) Snider JD, Cohen HB, Chenoweth RG. Acute ischemic retinopathy secondary to intraocular injection of gentamicin. *In* SJ Ryan, AK Dawson, HL Little (eds), *Retinal diseases*, 1st ed, p 227-232, Grune & Stratton, Orlando, Florida, 1985
- 53) Conway BP, Campochiaro PA. Macular infarction after endophthalmitis treated with vitrectomy and intravitreal gentamicin. *Arch Ophthalmol* 104: 367-371, 1986
- 54) McDonald HR, Schatz H, Allen AW, Chenoweth RG, Cohen HB, Crawford JB, Klein R, May DR, Snider III JD. Retinal toxicity secondary to intraocular gentamicin injection. *Ophthalmology* 93: 871-877, 1986
- 55) 三木大二郎, 矢田浩二, 前田利根, 樋田哲夫, 藤原隆明. 抗生剤の硝子体注入による薬物性網膜障害. あたらしい眼科 7: 143-145, 1990
- 56) Verma L, Arora R, Sachdev MS. Macular infarction after intravitreal injection of amikacin. *Can J Ophthalmol* 28: 241-243, 1993
- 57) 大桃明子. Norfloxacin, Ofloxacin の硝子体内注入に関する基礎的検討—第II報 網膜毒性—. あたらしい眼科 8: 651-654, 1991
- 58) Mochizuki K, Higashide T, Torisaki M, Yamashita Y, Komatsu M, Tanahashi T, Ohkubo S, Ogata M, Ohnishi Y. Effects of norfloxacin on the retina in rabbits. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 233: 173-180, 1995
- 59) 鳥崎真人. 塩酸ロメフロキサシンの硝子体内許容投与量とその眼内動態に関する研究. 十全医会誌 103: 491-516, 1994
- 60) Mochizuki K, Torisaki M, Wakabayashi K. Effects of vancomycin and ofloxacin on rabbit ERG in vivo. *Jpn J Ophthalmol* 35: 435-445, 1991
- 61) Marchese AL, Slana VS, Holmes EW, Jay WM. Toxicity and pharmacokinetics of ciprofloxacin. *J Ocul Pharmacol* 9: 69-76, 1993
- 62) Stevens SX, Fouraker BD, Jensen HG. Intraocular safety of ciprofloxacin. *Arch Ophthalmol* 109: 1737-1743, 1991
- 63) 酒井宏之, 小松雅樹, 鳥崎真人, 望月清文, 岡山欣彦, 北野貢市, 河崎一夫. ニューキノロン系抗菌剤ノルフロキサシンの家兎網膜に及ぼす影響—*In vitro* ERG による検討—. あたらしい眼科 8: 929-932, 1991
- 64) 酒井宏之, 望月清文, 鳥崎真人, 山下陽子, 小松雅樹, 棚橋俊郎, 岡山欣彦. オフロキサシンのウサギ網膜に及ぼす影響. *眼紀* 43: 1226-1231, 1992
- 65) 酒井宏之, 望月清文, 鳥崎真人. ロメフロキサシンのウサギ網膜に及ぼす影響. *日眼会誌* 97: 812-819, 1993
- 66) Wachtmeister L, Dowling JE. The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol & Visual Sci* 17: 1176-1188, 1978
- 67) Heynen H, Wachtmeister L, van Norren D. Origin of the oscillatory potentials in the primate retina. *Vision Res* 25: 1365-1373, 1985
- 68) 米村大蔵, 河崎一夫. c波. 臨床網膜電図学, 第1版, 78-88頁, 医学書院, 東京, 1985
- 69) 渡辺邦友, 加藤直樹, 武藤吉徳, 板東香お里, 上野一恵. Levofloxacin (DR-3355) の嫌気性菌に対する抗菌活性. *Chemotherapy* 40 (S-3): 57-63, 1992
- 70) 長瀧重智. 硝子体からの物質輸送. 第7回硝子体研究会記録集, 3-12頁, 世界保険通信社, 東京, 1990
- 71) Duguid JP, Ginsberg M, Fraser IC, Macaskill J, Michaelson IC, Robson JM. Experimental observations on the intravitreal use of penicillin and other drugs. *Br J Ophthalmol* 31: 193-211, 1947
- 72) Daily MJ, Peyman GA, Fishman G. Intravitreal injection of methicillin for treatment of endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 76: 343-350, 1973
- 73) Barza M, Kane A, Baum J. Pharmacokinetics of intravitreal carbenicillin, cefazolin, and gentamicin in rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol & Visual Sci* 24: 1602-1606, 1983
- 74) Bennett TO, Peyman GA. Use of tobramycin in eradicating

experimental bacterial endophthalmitis. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 191: 93-107, 1974

75) 井上慎三, 松村香代子, 西原 勝, 三崎昌史. ヒトにおけるロメフロキサシン内服後の特異な房水内動態—とくにメラニンの関与について—. あたらしい眼科 10: 87-90, 1993

76) Zemel E, Loewenstein A, Lei B, Lazar M, Perlman I. Ocular pigmentation protects the rabbit retina from gentamicin-induced toxicity. Invest Ophthalmol & Visual Sci 36: 1875-1884, 1995

77) Fukuda M, Sasaki K. Changes in the antibacterial activity of melanin-bound drugs. Ophthalmic Res 22: 123-127, 1990

78) 小室正勝, 小宮千鶴, 堀 弥, 石田了三, 大久保秀夫.

高速液体クロマトグラフィーによるメラニン含有眼組織中 Norfloxacin 濃度測定方法の検討. あたらしい眼科 10: 1755-1759, 1993

79) Okazaki O, Aoki H, Hakusui H. High-performance liquid chromatographic determination of (S)-(-)-ofloxacin and its metabolites in serum and urine using a solid-phase clean-up. J Chromatog 563: 313-322, 1991

80) Campochiaro PA, Green WR. Toxicity of intravitreal ceftazidime in primate retina. Arch Ophthalmol 110: 1625-1629, 1992

**Retinal Tolerance and Pharmacokinetics of Levofloxacin** Shinji Ohkubo, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Jusen Med Soc., **106**, 339 — 363 (1997)

**Key words** levofloxacin, melanin, intravitreal injection, retinal tolerance, intraocular pharmacokinetics

#### Abstract

The nontoxic intravitreal dosage and intraocular pharmacokinetics of levofloxacin (LVFX) after its intravitreal and oral applications were studied in albino and pigmented rabbits to establish ophthalmic usage of LVFX by topical and systemic administrations. The effects of LVFX and its isomer (DR-3354) on the retina were evaluated by in-vitro electroretinogram (ERG) in albino rabbits. The effects of intravitreal injection of LVFX on the ERG, visually evoked potential (VEP) and retinal histology were also studied in albino and pigmented rabbits. The intraocular penetration of LVFX was studied in albino and pigmented rabbits after an oral administration of 20 mg/kg <sup>14</sup>C-LVFX. The in-vitro ERG remained unchanged during perfusion with 300  $\mu$ M of LVFX and 100  $\mu$ M of DR-3354. The oscillatory potential diminished with 500  $\mu$ M of LVFX and 300  $\mu$ M of DR-3354. Thus, the effects of LVFX and its isomer on the retina were different. An intravitreal injection of 200 or 500  $\mu$ g LVFX caused no ERG changes. The oscillatory potential transiently deteriorated with intravitreal 1000 and 2000  $\mu$ g doses of LVFX in albino and pigmented rabbits. No abnormal changes were observed in the VEP and retinal histology with any intravitreal LVFX dosage mentioned above. The LVFX concentration in the melanin-containing tissues, such as the iris-ciliary body and the choroid-retina, was significantly higher in pigmented rabbits than in albino rabbits 2 hours after an oral administration. The LVFX concentration in the ocular tissues without melanin was similar in albino and pigmented rabbits 2 hours after an oral administration. The intravitreal concentration of LVFX was similar in both albino and pigmented rabbits at all measuring points after intravitreal injection of LVFX. The LVFX concentration in the melanin-containing tissues, such as the iris-ciliary body and the choroid-retina, was significantly higher in pigmented rabbits than in albino rabbits after intravitreal injection. Hence, the intraocular penetration and pharmacokinetics of LVFX were markedly affected by its affinity for melanin. An intravitreal injection of 500  $\mu$ g of LVFX was nontoxic to the rabbit retina and maintained its intravitreal concentration above the 90% minimum inhibitory concentration of LVFX against the main bacteria responsible for endophthalmitis for at least 24 hours. These results indicate that LVFX would be useful for the treatment of bacterial endophthalmitis. Because of its persistency in melanin-containing ocular tissues, due attention should be paid to avoiding ocular hazard effects in repeated topical administration and long-term systemic administration of LVFX.